

Université de Montréal

**Identification et caractérisation des cibles transcriptionnelles de
ETV6, un facteur de transcription impliqué dans la leucémie de
l'enfant.**

Par

Camille Malouf

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures en vue de
l'obtention du grade de Docteur en Biochimie

8 février 2012

© Camille Malouf

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée :

**Identification et caractérisation des cibles transcriptionnelles de
ETV6, un facteur de transcription impliqué dans la leucémie de
l'enfant.**

Présentée par : Camille Malouf

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Gerardo Ferbeyre, président-rapporteur

Dr. Daniel Sinnett, directeur de recherche

Dr. André Tremblay, membre du jury

Dr. Stéphane Gobeil, examinateur externe

Dr. Jacques Archambault, représentant du doyen de la Faculté des
études supérieures et postdoctorales

Résumé.

La leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) est responsable d'environ 25% de l'ensemble des cancers pédiatriques. Chez 85% des enfants diagnostiqués, la LLA entraîne une prolifération massive et incontrôlée de lymphocytes immatures de type précurseurs B dans la moelle osseuse (LLA pré-B). Des avancées intéressantes ont été faites au cours des trente dernières années et ont mené à une augmentation de l'efficacité des traitements thérapeutiques. Plus de 80% des enfants atteints de LLA seront guéris de cette maladie. Malheureusement, ces traitements manquent de spécificité à cause du manque de connaissances sur les mécanismes moléculaires impliqués durant l'initiation et le développement de la LLA pré-B pédiatrique. En d'autres termes, nous connaissons peu de chose sur l'étiologie de cette maladie.

Plus de 25% des enfants atteints de la LLA pré-B présentent la translocation chromosomique $t(12;21)(p13;q22)$ qui implique les gènes *ETV6* et *AML1*. Celle-ci est formée *in utero* et mène à l'expression de la protéine chimère transcriptionnelle ETV6-AML1, dont la présence seule ne suffit pas au développement de la LLA pré-B. Ainsi, d'autres événements génétiques sont nécessaires au développement de cette leucémie. La délétion de l'allèle résiduel de *ETV6* est un événement génétique fréquemment rencontré au moment du diagnostic de la LLA pré-B $t(12;21)+$. Cette délétion entraîne l'inactivation complète de *ETV6* dans les lymphocytes pré-B leucémiques. *ETV6* est un répresseur transcriptionnel de la famille Ets. Mon hypothèse de recherche est que *ETV6* agit comme gène suppresseur de tumeur dans la LLA pré-B pédiatrique. L'inactivation de *ETV6* causerait une dérégulation de l'expression de ses cibles

transcriptionnelles et, par le fait même, favoriserait l'initiation et le déroulement de la leucémogenèse pédiatrique. Dans le cadre de mon projet, comme peu de cibles transcriptionnelles de ETV6 sont connues, j'ai effectué des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine et des essais luciférases qui ont permis d'identifier six nouvelles cibles transcriptionnelles: *TP53* (p53 et $\Delta 133p53$), *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* et *LUM*. J'ai démontré que la régulation transcriptionnelle médiée par ETV6 requiert la présence de ses deux domaines fonctionnels: PNT (interactions protéiques) et ETS (liaison à l'ADN). Ces domaines favorisent la reconnaissance d'un site EBS consensus dans une région située près du promoteur de base. Ce mécanisme peut dépendre du promoteur régulé par ETV6, mais également du contexte cellulaire. Des études fonctionnelles réalisées sur des lymphocytes pré-B leucémiques ont permis de mesurer l'impact de la dérégulation de l'expression des cibles transcriptionnelles de ETV6 sur trois voies biologiques: la prolifération cellulaire, l'apoptose induite par un stress génotoxique et la migration cellulaire dirigée par la voie de signalisation CXCL12/CXCR4. Ceci a permis de démontrer l'implication des gènes *SPHK1*, *IL-18* et *PTGER4* durant la leucémogenèse pédiatrique.

Cette étude est une des premières à suggérer le rôle de ETV6 comme gène suppresseur de tumeur dans la LLA pré-B pédiatrique. Suite à l'inactivation du répresseur transcriptionnel ETV6, l'augmentation de l'expression de ses cibles transcriptionnelles favoriserait la prolifération et la survie des lymphocytes pré-B leucémiques dans la moelle osseuse. L'identification de nouveaux gènes impliqués dans le développement de la LLA pré-B pédiatrique ouvre la porte au

développement de nouveaux traitements thérapeutiques qui pourront présenter une meilleure spécificité envers l'étiologie de la maladie.

Mots-clés : cancer pédiatrique, leucémie lymphoblastique aiguë, oncogenèse, facteur de transcription ETV6, régulation transcriptionnelle, études fonctionnelles.

Abstract.

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) accounts for approximately 25% of all paediatric cancers. Approximately 85% of ALL cases happen in immature B precursors lymphocytes (pre-B ALL). Pre-B ALL is a sporadic cancer that leads to the massive proliferation of leukemia pre-B lymphocytes in the bone marrow. During the past 30 years, the scientific community has developed efficient therapeutic treatments against paediatric ALL, reaching more than 80% cure rate. However, these treatments lack specificity because of the lack of knowledge regarding the molecular mechanisms involved in the initiation and progression of paediatric pre-B ALL. In other words, we know little about the aetiology of this disease.

Approximately 25% of children affected with pre-B ALL carry the chromosomal translocation $t(12;21)(p13;q22)$ involving the *ETV6* and *AML1* genes. This translocation originates *in utero* and leads to the expression of the transcriptional chimera ETV6-AML1, which alone is insufficient to trigger the development of pre-B ALL. Therefore, other genetic events would be required to initiate paediatric leukemogenesis. The deletion of the residual allele of *ETV6* is frequently observed at the diagnosis of pre-B ALL $t(12;21)^+$. This leads to the complete inactivation of ETV6 in leukemia pre-B lymphocytes. ETV6 is a transcriptional repressor of the Ets family. My research hypothesis is that *ETV6* acts as a tumour suppressor gene in paediatric pre-B ALL. The inactivation of ETV6 would lead to the deregulated expression of its transcriptional targets and, consequently, would favour the initiation and progression of paediatric leukemogenesis.

Given the fact that only very few ETV6 transcriptional targets are known, I initially performed chromatin immunoprecipitation experiments and luciferase assays that enabled the identification of six novel transcriptional targets: *TP53* (p53 and $\Delta 133p53$), *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM*. The ETV6-mediated transcriptional regulation involves both functional domains: PNT (protein interactions) and ETS (DNA-binding domain). These functional domains facilitate the recognition of consensus EBS sites located in a region close to the basal promoter, a molecular mechanism used according to the target promoter and cellular context. Functional studies using leukemia pre-B lymphocytes were useful to understand the role of the ETV6 transcriptional targets during cell proliferation, induction of apoptosis and cell migration through the CXC12/CXCR4 signalling pathway. These functional studies showed the implication of *SPHK1*, *IL-18* and *PTGER4* genes during paediatric leukemogenesis.

This study is one of the first to support the role of ETV6 as a tumour suppressor gene in paediatric pre-B ALL. Once ETV6 is inactivated, the increased expression of its transcriptional targets favours the proliferation and survival of leukemia pre-B lymphocytes in the bone marrow. The identification of new genes involved in the development of paediatric pre-B ALL opens new doors to the development of therapeutic treatments with a better specificity toward the aetiology of the disease.

Keywords: paediatric cancer, acute lymphoblastic leukemia, oncogenesis, ETV6 transcription factor, transcriptional regulation, functional studies.

Table des matières.

Résumé.....	v
Abstract.....	viii
Table des matières.....	xi
Liste des tableaux.....	xv
Liste des figures.....	xvi
Liste des abréviations.....	xix
Remerciements.....	xxiv
Chapitre 1. Introduction.....	1
1.1. Les cancers pédiatriques.....	2
1.2. La leucémie lymphoblastique aiguë de l'enfant.....	3
1.2.1. Incidence.....	3
1.2.2. Étiologie de la LLA pré-B pédiatrique.....	4
1.2.3. Les conséquences de la LLA pré-B pédiatrique.....	6
1.3. La génétique de la LLA pré-B pédiatrique.....	8
1.3.1. L'état des connaissances.....	8
1.3.2. La translocation chromosomique t(12;21)(p13;q22) ETV6-AML1.....	9
1.3.3. L'hyperdiploïdie.....	10
1.3.4. La surexpression de CRLF2.....	10
1.3.5. La translocation chromosomique t(1;19)(q23;p13) E2A-PBX1.....	10
1.3.6. La translocation chromosomique t(9;22)(q34;q11.2) BCR-ABL1.....	11
1.3.7. La translocation chromosomique t(4;11)(q21;q23) MLL-AF4.....	12
1.3.8. L'amplification intra-chromosomique du chromosome 21.....	13
1.3.9. L'hypodiploïdie.....	14
1.3.10. La translocation chromosomique t(8;14)(q23;q32.3).....	14
1.4. La translocation chromosomique t(12;21)(p13;q22) ETV6-AML1.....	15
1.4.1. Origine prénatale de la t(12;21)(p13;q22) ETV6-AML1.....	15
1.4.2. ETV6-AML1 ne suffit pas au développement de la LLA pré-B pédiatrique.....	15
1.4.3. ETV6-AML1 inhibe la différenciation des lymphocytes B.....	17
1.4.4. ETV6-AML1 favorise l'auto-renouvellement des cellules pré-leucémiques.....	18

1.4.5. ETV6-AML1 désensibilise la cellule pré-leucémique aux signaux de TGFβ.	18
1.4.6. ETV6-AML1 participerait à la phase de latence de la LLA pré-B pédiatrique.	19
1.5. Les délétions génomiques associées à la translocation chromosomique t(12;21)(p13;q22) ETV6-AML1.	20
1.5.1. Les délétions génomiques de CDKN2A/B, Pax5 et del(q6).	21
1.5.2. La délétion hémizygote du locus ETV6.	23
1.6. Le facteur de transcription ETV6.	24
1.6.1. ETV6 est un répresseur transcriptionnel de la famille Ets.	24
1.6.2. Le domaine PNT est impliqué dans les interactions protéiques.	27
1.6.3. Le domaine ETS est responsable de la liaison à l'ADN.	29
1.6.4. Les modifications post-traductionnelles du répresseur transcriptionnel ETV6.	30
1.6.5. La fonction biologique de ETV6.	31
1.6.6. Les cibles transcriptionnelles du facteur de transcription ETV6.	33
1.7. Hypothèse de recherche	36
1.8. But principal	36
1.9. Objectifs spécifiques	37
Chapitre 2. Premier article.	39
2.1. Présentation du premier article.	40
2.2. Abstract.	43
2.3. Introduction.	44
2.4. Results.	48
2.5. Discussion.	57
2.6. Material and methods	63
2.8. Author Contributions.	69
2.9. Conflicts of Interest.	70
2.10. References.	71
2.11. Figure Legends.	77
2.12. Figures and tables.	82
Chapitre 3. Deuxième article.	95
3.1. Présentation du deuxième article.	96

3.2. Abstract.	99
3.3. Introduction.	100
3.4. Results.	104
3.5. Discussion.	118
3.6. Material and Method.	123
3.7. Conflicts of interest.	130
3.8. Acknowledgements.	131
3.9. References.	132
3.10. Figure legends.	136
3.11. Figures and Tables.	147
3.12. Supplementary figures and tables.	156
Chapitre 4. Discussion.	97
4.1. Mise en contexte.	170
4.2. Le réseau de régulation transcriptionnelle de ETV6.	171
4.2.1. Six nouvelles cibles transcriptionnelles de ETV6.	171
4.2.2. ETV6 réprime la transcription dans une région près du promoteur de base.	174
4.2.3. Les domaines PNT et ETS sont requis lors de la répression transcriptionnelle des nouvelles cibles de ETV6.	178
4.2.4. La répression transcriptionnelle médiée par ETV6 implique des séquences consensus EBS.	179
4.3. Les cibles transcriptionnelles de ETV6 et la leucémogénèse pédiatrique.	185
4.3.1. ETV6 influence la réponse biologique.	185
4.3.2. Les isoformes du gène <i>TP53</i>	186
4.3.3. Lumican et l'oncogénèse.	187
4.3.4. SPHK1 et PTGER4 augmentent le taux de prolifération des cellules leucémiques.	189
4.3.5. IL-18 favorise l'entrée en apoptose des lymphocytes pré-B leucémiques suite à un stress génotoxique.	192
4.3.6. SPHK1 et PTGER4 inhibent l'entrée en apoptose des lymphocytes pré-B leucémiques suite à un stress génotoxique.	194

4.3.7. SPHK1, IL-18 et PTGER4 favorisent la migration des lymphocytes pré-B leucémiques par la voie CXCL12/CXCR4.	196
Chapitre 5. Perspectives.	201
5.1. Le réseau de régulation génétique de ETV6.....	202
5.2. Les cibles transcriptionnelles de ETV6 et la leucémogénèse pédiatrique.	204
5.3. Développement de nouveaux traitements contre la LLA pré-B pédiatrique.	206
Chapitre 6. Conclusion.....	207
Références.	211

Liste des tableaux.

Tableau I. Incidence et proportion de survie observée sur cinq ans des cancers affectant la population pédiatrique canadienne âgée de 0-19 ans.

Tableau II. Fréquence, pronostic et survie sans événement sur cinq ans des altérations génomiques et génétiques retrouvées chez la LLA pré-B pédiatrique.

Table III. Genetic and clinical features of 26 pre-B ALL patients and 7 normal individuals.

Table IV. Fisher's exact test to compare the expression status of p53 γ , Δ 133p53 α and Δ 133p53 β mRNA in the bone marrow of 26 pre-B ALL patients and 7 control individuals.

Table V. Clinical features at diagnosis of pre-B ALL patients compared to the expression status of p53 γ , Δ 133p53 α and Δ 133p53 β mRNA.

Table VI. Site-directed mutagenesis of the predicted consensus EBS located in the classic and alternative basal promoters of *TP53*.

Table VII. Primers used for molecular cloning, site-directed mutagenesis, chromatin immunoprecipitation and nested PCR.

Table VIII. EBS are involved in the ETV6-mediated transcriptional repression, depending on the cellular context.

Table IX. Primers used for molecular cloning, site-directed mutagenesis and chromatin immunoprecipitation.

Tableau X. Les cibles transcriptionnelles connues d'ETV6.

Liste des figures.

Figure 1. Le développement spatio-temporel de la leucémie lymphoblastique aiguë pré-B de l'enfant.

Figure 2. La protéine chimérique ETV6-AML1 participe à la phase de latence de la LLA pré-B pédiatrique.

Figure 3. Analyse de l'arbre oncogénétique des « copy-number alteration » de la LLA pré-B t(12;21)+.

Figure 4. Le facteur de transcription ETV6 et ses partenaires de translocation chromosomiques dans la leucémie.

Figure 5. Le facteur de transcription ETV6 et ses domaines fonctionnels.

Figure 6. The expression of p53 and $\Delta 133p53$ mRNA in the bone marrow of pre-B ALL patients.

Figure 7. ETV6 binds the classic and alternative promoter of *TP53*.

Figure 8. ETV6 alone can repress the activity of the *TP53* classic and alternative promoters.

Figure 9. The Pointed and ETS domains are essential to the ETV6-mediated transcriptional regulation of the *TP53* promoters.

Figure 10. Ets-Binding Sites are implicated in the transcription regulation of the *TP53* classic promoter by ETV6.

Figure 11. The ETV6-mediated transcriptional repression of the *TP53* alternative promoter does not require Ets-Binding Sites.

Figure 12. Proposed models for the transcriptional regulation of p53 and $\Delta 133$ p53 isoforms by ETV6.

Figure 13. ETV6 binds the proximal promoters of *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM*.

Figure 14. ETV6 regulates transcription through its Pointed and ETS functional domains.

Figure 15. SPHK1 is a positive regulator of leukemia cell survival and migration.

Figure 16. IL-18 affects leukemia cell migration through the CXCL12/CXCR4 signalling pathway.

Figure 17. PTGER4 is involved during leukemia cell proliferation and migration through the CXCL12/CXCR4 signalling pathway.

Figure 18. PGE₂ and the PTGER4 antagonist L-161982 both decelerate leukemia cell proliferation.

Figure 19. SPHK1, IL-18 and PTGER4 are involved in childhood pre-B ALL.

Figure 20. *SPHK1* is a transcriptional target of ETV6.

Figure 21. *IL-18* is a transcriptional target of ETV6.

Figure 22. *PTGER4* is a transcriptional target of ETV6.

Figure 23. *LUM* is a transcriptional target of ETV6.

Figure 24. Ets-Binding Sites are implicated in the ETV6-mediated transcriptional repression of the *SPHK1* promoter in HeLa cells.

Figure 25. Ets-Binding Sites are implicated in the ETV6-mediated transcriptional repression of the *IL-18* promoter in HeLa cells.

Figure 26. Ets-Binding Sites are implicated in the ETV6-mediated transcriptional repression of the *PTGER4* promoter in HeLa cells.

Figure 27. Ets-Binding Sites are implicated in the ETV6-mediated transcriptional repression of the *LUM* promoter in Jurkat cells.

Figure 28. SPHK1, IL-18 and PTGER4 do not influence the cell cycle distribution of leukemia cells over a period of 24 hours.

Figure 29. The DNA topoisomerase-II inhibitor camptothecin induces apoptosis in leukemia cells.

Figure 30 : Les facteurs de transcription de la famille Ets.

Figure 31. Modèles de régulation transcriptionnelle par ETV6.

Figure 32. L'inactivation du facteur de transcription ETV6 est impliquée dans le développement de la LLA pré-B pédiatrique.

Liste des abréviations.

ABL1: c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase

ABL2: v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2

ACS2 (ou ACSL5/6): acyl-CoA synthetase long-chain family member 5/6

ADNc: ADN codant

AF4: AF4/FMR2 family member 1

ALL: acute lymphoblastic leukemia

AMD 3100: plerixafor

AML1 (ou CBFA2): acute myeloid leukemia 1 protein

ARNm / mRNA: ARN messenger / messenger RNA

ARNT: aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator

BCL-XL: B-cell lymphoma-extra large

BCR: breakpoint cluster region

BTG1: B-cell translocation gene 1, anti-proliferative

BTL (ou CHIC2): cysteine-rich hydrophobic domain 2

BTLA: B and T lymphocyte associated

C/EBP α : CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha

c20orf94: chromosome 20 open reading frame 94

C57BL/6: C 57 black 6

CD19: CD19 molecule

CD200: CD200 molecule

CD34: CD34 molecule

CD38: CD38 molecule

CDKN2A: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

CDKN2B: cyclin-dependent kinase inhibitor 2B

CDKN2D: cyclin-dependent kinase inhibitor 2D

cDNA: coding DNA

CDX2: caudal type homeobox 2

CNA: copy-Number Alteration

COX1: prostaglandin G/H synthase 1

COX2: prostaglandin G/H synthase 2

CRLF2: cytokine receptor-like factor 2

CXCL12: C-X-C motif chemokine 12
CXCR4: C-X-C chemokine receptor type 4
E2A: transcription factor E2-alpha
EBS: Ets-binding site
EHF: ets homologous factor
ELF1: E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)
ELF2: E74-like factor 2 (ets domain transcription factor)
ELF3: E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific)
ELF4: E74-like factor 4 (ets domain transcription factor)
ELF5: E74-like factor 5 (ets domain transcription factor)
ELK1: ELK1, member of ETS oncogene family
ELK3: ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)
ELK4: ETS-domain protein (SRF accessory protein 1)
ERF: ets2 repressor factor
ERG: v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (avian)
Ets: E-twenty six
ETS1: protein c-ets-1
ETS2: protein c-ets-2
ETV1: ETS translocation variant 1
ETV2: ETS translocation variant 2
ETV3: ETS translocation variant 3
ETV3L: ets variant 3-like
ETV4: ETS translocation variant 4
ETV5: ETS translocation variant 5
ETV6: ETS translocation variant 6
ETV7: ETS translocation variant 7
FEV: FEV (ETS oncogene family)
FGFR3: fibroblast growth factor receptor 3
FHIT: fragile histidine triad
FLI-1: friend leukemia integration 1 transcription factor
FLT3: receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3
GABPA: GA binding protein transcription factor, alpha subunit 60kDa

Gas2: growth arrest-specific 2
GFP: green fluorescent protein
GPIIb: platelet glycoprotein IIb alpha chain
GPIX: platelet glycoprotein IX
Grb2: growth factor receptor-bound protein 2
GTPase: guanosine triphosphate hydrolase
GWAS: genome Wide Association Study
HCMEC: human cardiac microvascular endothelial cells
HDAC3: histone deacetylase 3
HDAC9: histone deacetylase 9
H-L(3)MBT: lethal(3)malignant brain tumor-like protein 3
HLBX9 (ou MNX1): motor neuron and pancreas homeobox 1
HSC: hematopoietic stem cell
IFN- γ : interferon-gamma
IL-18: interleukine-18
IRES: internal ribosome entry site
IRF8 (ou ICSBP): interferon regulatory factor 8
JAK2: Janus kinas 2
LLA: leucémie lymphoblastique aiguë
LMA: leucémie méloïde aiguë
LUM: lumican
MCSFR: macrophage colony-stimulating factor receptor
MDS1-EV1: MDS1 and EVI1 complex locus
MDS2: myelodysplastic syndrome 2 translocation associated
miRNA: microRNA
MLL: histone-lysine N-methyltransferase MLL
MMP-3: Matrix metalloprotein-3
MN1: meningioma (disrupted in balanced translocation) 1
mSin3A: paired amphipathic helix protein Sin3a
MYC: myc proto-oncogene protein
N-CoR: nuclear receptor corepressor
NOD: non-obese diabetic

NR3C1: nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)
NR3C1: nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2 (glucocorticoid receptor)
NTRK3: neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3
Pax5: paired box 5
PBX1: pre-B-cell leukemia transcription factor 1
PDGFR β : platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
PER1-AS: period homolog 1 (Drosophila)
PGE2: prostaglandin E2
PIAS3: protein inhibitor of activated STAT, 3
PNT: pointed
Pré-B: précurseur-B
Pré-T: précurseur T
PTGER4: prostaglandin E2 receptor EP4 subtype
PU.1: transcription factor PU.1
RUNX1: runt-related transcription factor 1
S1P: sphingosine-1-phosphate
SB transposase: sleeping Beauty transposase
SCID: severe combined immunodeficiency
shRNA: small hairpin RNA
SMRT: silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
SPDEF: SAM pointed domain containing ets transcription factor
SPHK1: sphingosine kinase 1
SPI1: spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi1
SPIB: Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)
SPIC: Spi-C transcription factor (Spi-1/PU.1 related)
Stat3: signal transducer and activator of transcription 3
STL: six-twelve leukemia
SYK: spleen tyrosine kinase
TBL1XR1: transducin (beta)-like 1 X-linked receptor 1
TCF3: transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)
TCF4: transcription factor 4

TEL: ETS translocation variant 6

TFDP1: transcription factor Dp-1

TGF β : transforming growth factor, beta

TP53: tumor protein 53

TTL: twelve-thirteen translocation leukemia

UBC9 (ou UBE2I): ubiquitin-conjugating enzyme E2I

VEGFA: vascular endothelial growth factor A

ZAP70: zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa

Remerciements.

J'ai eu le privilège de travailler avec des personnes exceptionnelles au cours des cinq dernières années. En espérant que je n'oublie personne...

Mon directeur de recherche, Daniel Sinnett, m'a offert un projet de recherche rempli de défis et de difficultés, mais également un projet de recherche qui permettra de redonner aux patients à long terme. Ses conseils précieux m'ont guidé tout au long de ma formation, ce qui nous a permis de réaliser des avancées intéressantes sur le développement de la leucémie de l'enfant.

Je remercie particulièrement Josiane Larose, Sylvie Langlois, Rocio Sanchez et Patrick Beaulieu. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec vous.

Une pensée spéciale pour Ekat A. Kritikou. Ton passage au laboratoire aura été trop bref. Merci pour les belles discussions scientifiques.

Je remercie André Tremblay et Tony Antakly pour votre participation à mes comités de thèse et à votre critique scientifique très constructive.

Une pensée pour les personnes que j'ai rencontrées durant mes trois années d'implication dans l'association étudiante de biochimie (l'AÉCSBUM, évidemment), Vous allez me manquer pour les cinq prochaines années (Étienne Lepage, Alexandre Desjardins, Éric Bonneau, Jean-Sébastien Parent, Amélie Forget,

Patricia Bouchard, Mathieu Coinçon, Mathieu Vernier, Emmanuelle Saint-Germain, Stéphanie Gravel, Xavier Deschênes-Simard, Thomas Morse, Delphine Bouilly).

Merci à ma meilleure amie, Marie-Pascale Tremblay-Champagne, simplement pour avoir été là depuis dix ans. Des amies comme toi, c'est très rare de nos jours.

M. Simon Gélinas (pour son charme).

Finalement, je dois remercier ma famille. Vous aurez toujours la plus grande place dans mon cœur. C'est cliché, mais c'est vrai. Merci à mes parents, Lise Martel et François Malouf, pour m'avoir encouragé à travailler sur ce que j'aime. Mes cousins et cousines (Mathieu Malouf, Charles Malouf, Anne Martel, Laurence Martel), pour m'avoir fait rire durant toutes ces années. Merci à mon neveu (Henri), un être bizarre et attachant qui ne partage pas mon patrimoine génétique. Merci à mes tantes et oncles (Renée Martel, France Malouf, Lise Malouf, Jean-Luc Martel, Benoît Martel, Charles Martel, Bernard Malouf et Jacques Malouf).

Chapitre 1. Introduction.

Cette thèse de doctorat vise à comprendre le rôle d'une altération génétique, soit l'inactivation du facteur de transcription ETV6, durant le développement de la leucémie de l'enfant. L'introduction débutera par un survol sur les cancers pédiatriques (*section 1.1.*), suivie d'une présentation de la pathologie étudiée, soit la leucémie lymphoblastique aiguë pré-B pédiatrique (*section 1.2.*). Les altérations génétiques associées avec la leucémie lymphoblastique aiguë pré-B seront également présentées (*section 1.3.*). Une altération génétique fréquemment retrouvée chez les enfants atteints de la leucémie lymphoblastique aiguë pré-B est la translocation chromosomique t(12;21)(p13;q22) ETV6-AML1 (*section 1.4.*). Cette translocation seule ne suffit pas à l'initiation de la leucémogénèse pédiatrique, mais elle a été associée à plusieurs délétions génomiques (*section 1.5.*). Une de ces délétions implique le facteur de transcription ETV6 (*section 1.6.*). Ce chapitre sera conclu avec la présentation de l'hypothèse de recherche (*section 1.7.*), le but principal (*section 1.8.*) et les objectifs spécifiques (*section 1.9.*) qui guident cette thèse de recherche en biochimie.

1.1. Les cancers pédiatriques.

Les cancers pédiatriques représentent moins de 1% de l'ensemble des cancers.¹ Puisqu'environ 1 enfant sur 310 sera atteint d'un cancer, il s'agit de la principale cause de mortalité par maladies chez les enfants.¹⁻³ La leucémie est le cancer pédiatrique le plus courant. Chez les enfants âgés entre 0-19 ans, la leucémie est responsable d'environ 27% des nouveaux cas de cancer. Parmi les autres cancers pédiatriques, nous retrouvons également les lymphomes (16%), les cancers du cerveau et du système nerveux (16%), les tumeurs épithéliales malignes (9%), les tumeurs germinales (6%), le neuroblastome (5%), les tumeurs osseuses (5%), le néphroblastome (4%), le rhabomyosarcome (2%), le rétinoblastome (1%).¹ Ces données sont présentées au tableau I.

Le spectre de tumeurs présentes chez la population pédiatrique est différent de celui de l'adulte. Les symptômes, les traitements et les taux de survie sont également différents.¹⁻³ Ces différences au niveau du type de tumeur et de la latence de la pathologie sont attribuées à différents facteurs dont les facteurs génétiques, environnementaux et socio-économiques.^{4,5}

Tableau I. Incidence et proportion de survie observée sur cinq ans des cancers affectant la population pédiatrique canadienne âgée de 0-19 ans.

Cancer pédiatrique	Incidence (%)	Proportion de survie observée sur 5 ans (%)
Leucémies	27	84
Lymphomes	16	89
Cancers du système nerveux central	16	71
Tumeurs épithéliales malignes	9	93
Tumeurs germinales	6	89
Neuroblastomes	5	75
Tumeurs osseuses	5	68
Néphroblastomes	4	87
Rhabdomyosarcomes	2	68
Rétinoblastomes	1	96

Ces données sont tirées du rapport « Statistiques Canadiennes sur le cancer 2011 ».¹

1.2. La leucémie lymphoblastique aiguë de l'enfant.

1.2.1. Incidence.

La leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) est la forme de leucémie la plus courante chez la population pédiatrique. La LLA représente environ 75% des cas de leucémie pédiatrique, alors que 15-20% seulement sont des leucémies myéloïdes aiguës (LMA).¹ Ces leucémies se définissent comme une prolifération incontrôlée d'un clone cellulaire anormal issu de lignée lymphocytaire ou myéloïde et bloqué à un stade précis de différenciation. La leucémie est un cancer sporadique du sang qui est initié dans le site principal de l'hématopoïèse adulte, soit la moelle osseuse.

Mon projet de thèse porte sur la LLA qui présente un pic d'incidence chez les enfants âgés de 2 à 5 ans. Environ 85% des enfants atteints d'une LLA présenteront une prolifération massive et incontrôlée de lymphocytes précurseur-B

dans la moelle osseuse.⁶ Les autres patients présenteront une LLA de type pré-T (15-20%), qui se caractérise par l'envahissement de lymphocytes précurseur-T dans la moelle osseuse.⁶ Pour la suite du texte, la LLA de type pré-B sera dénotée LLA pré-B.

1.2.2. Étiologie de la LLA pré-B pédiatrique.

Le développement de la LLA pré-B est un processus multi-étape qui débute pendant le développement embryonnaire (*Figure 1*). Dans un premier temps, il y a formation d'un clone pré-leucémique *in utero* qui aura traversé les étapes de différenciation lymphoïde B suivantes: hémangioblaste en cellule souche hématopoïétique, cellule souche hématopoïétique en progéniteur myéloïde-lymphoïde, progéniteur myéloïde-lymphoïde en progéniteur lymphoïde commun, progéniteur lymphoïde commun en progéniteur B, progéniteur B en précurseur B.^{7,8} Cette cellule pré-leucémique se dissociera des processus normaux de la différenciation hématopoïétique lymphoïde B, ce qui l'empêchera compléter sa maturation en lymphocyte B mature. Ceci entraînera la séquestration du clone pré-leucémique dans les sites principaux de l'hématopoïèse fœtale (ex. placenta, foie) et adulte (moelle osseuse). Cette étape correspond à la phase de latence de la maladie (*Figure 1, étape 1*).⁹

Le clone pré-leucémique peut demeurer en latence chez l'enfant plusieurs années après la naissance.^{10,11} Chez une minorité d'enfants porteurs d'un clone pré-leucémique, le développement de la LLA pré-B sera initié par une activation de mécanismes moléculaires qui mettront fin à sa phase de latence et qui activeront sa prolifération dans la moelle osseuse. Cette étape correspond à la phase

d'initiation de la leucémogénèse (*Figure 1, étape 2*). Plusieurs théories sont proposées pour expliquer la nature de l'événement initiateur de la leucémogénèse pédiatrique. Mel Greaves propose que l'événement initiateur soit une infection virale. Ceci entraînerait une réponse dérégulée des lymphocytes T et une suppression transitoire de l'hématopoïèse via la sécrétion dérégulée de cytokines et de chimiokines.¹² La prolifération du clone pré-leucémique étant alors favorisée, il devient avantageux pour la cellule précancéreuse de mettre fin à sa phase de latence. Les travaux de notre groupe soutiennent que l'initiation de LLA pré-B requière l'acquisition d'une ou plusieurs altérations génétiques qui briseront l'équilibre présent entre l'ensemble des voies biologiques impliquées dans la prolifération et la mort cellulaire.^{6,13} Cette hypothèse de recherche sera discutée davantage (*voir section 1.3.*).

Le contexte spatial de la moelle osseuse est limité. Ainsi, durant le développement de la LLA pré-B, la prolifération des lymphocytes pré-B leucémiques entraînera une diminution de la synthèse des autres cellules hématopoïétiques dont les lymphocytes, les érythrocytes et les plaquettes. Ceci aura des conséquences désastreuses sur les fonctions physiologiques du patient, particulièrement au niveau des défenses immunitaires et du contrôle de la coagulation sanguine. Durant la progression de la LLA pré-B, les cellules leucémiques quittent le microenvironnement de la moelle osseuse pour atteindre la circulation périphérique et envahir des organes précis dont la rate, le foie, le système nerveux central et les ganglions lymphatiques.¹⁴ L'occupation des cellules leucémiques dans ces organes limitera leur renouvellement cellulaire et, éventuellement, leur fonction physiologique. Cette étape du développement

leucémique correspond à la phase de progression (*Figure 1, étape 3*).¹⁵ La LLA pré-B est donc une pathologie qui affecte non seulement les processus hématopoïétiques de la moelle osseuse, mais également les fonctions biologiques de plusieurs organes responsables du maintien du système immunitaire, des fonctions métaboliques et des capacités neurocognitives.

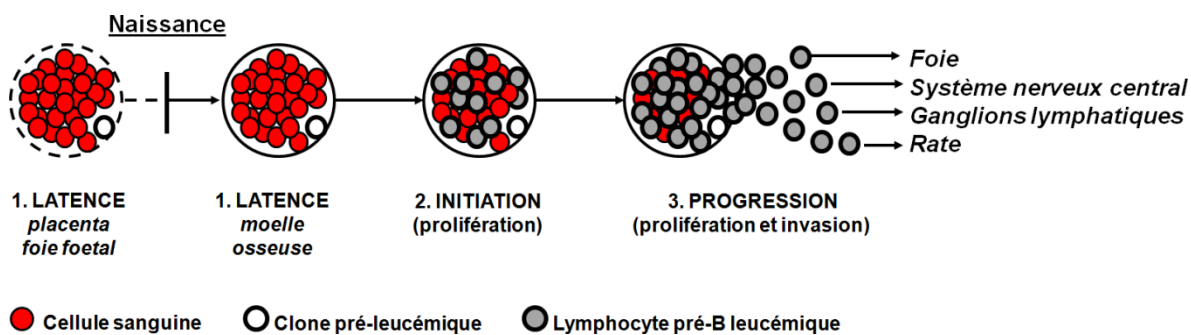


Figure 1 : Le développement spatio-temporel de la leucémie lymphoblastique aiguë pré-B de l'enfant. La leucémie se développe en trois phases: latence, initiation et progression. Le clone pré-leucémique suit les cellules hématopoïétiques dans les organes de l'hématopoïèse foétale (placenta, foie foetal) et adulte (moelle osseuse).

1.2.3. Les conséquences de la LLA pré-B pédiatrique.

De 1966 à 2007, le taux de survie sur 5 ans des enfants atteints de la LLA pré-B est passé de 21% à 91%.¹⁶ Cette hausse remarquable résulte du développement de traitements thérapeutiques qui éliminent efficacement les cellules leucémiques, que ce soit par l'utilisation d'une variété d'agents chimiothérapeutiques ou du perfectionnement des greffes de sang de cordon.⁶ Les traitements chimiothérapeutiques consistent en une phase de rémission-induction, une phase

de consolidation et une thérapie de continuation.¹⁷ La phase de rémission-induction vise à éliminer la majorité des lymphocytes pré-B leucémiques (> 99%) et à rétablir les fonctions physiologiques hématopoïétiques. Ceci se fait par l'administration de plusieurs drogues dont le glucocorticoïde (prednisone ou dexaméthasone), la vincristine et l'asparaginase et/ou l'antracycline. Lors de la phase de consolidation, des doses élevées de methotrexate et de mercaptopurine s'ajoutent aux agents chimiothérapeutiques utilisés lors de la phase de rémission-induction. Ceux-ci permettent d'éliminer les lymphocytes pré-B leucémiques ayant résisté à la phase de rémission-induction. Les patients avec un mauvais pronostic pourront alors recevoir une greffe de sang de cordon pour améliorer leur chance de vaincre la maladie. Finalement, la thérapie de continuation servira à diminuer le risque de rechute de la maladie et inclue généralement la mercaptopurine.

Il est donc rassurant de constater que les enfants atteints de la LLA pré-B réussissent à vaincre leur maladie. Malheureusement, les survivants présentent souvent des complications sérieuses dans les années suivant leur rémission. Ces complications incluent l'apparition d'un deuxième cancer, le développement de défauts neurocognitifs, l'apparition de problèmes endocrinologiques, des dysfonctions cardiaques et de l'ostéonécrose.¹⁸⁻²² Ces problèmes de santé accompagneront le survivant durant la majorité de sa vie et auront un impact négatif sur sa famille et ses proches.^{23,24} La qualité de vie du survivant est donc sérieusement compromise. Pour régler cette situation, il est important d'identifier et de comprendre les mécanismes moléculaires responsables de l'initiation et de la progression de la LLA pré-B de l'enfant. En d'autres termes, il faut mieux comprendre pour mieux guérir!

1.3. La génétique de la LLA pré-B pédiatrique.

1.3.1. L'état des connaissances.

Les causes de la leucémie sont inconnues. Le rôle joué par la susceptibilité génétique, les altérations chromosomiques, les mutations spontanées, les virus, les agents chimiques et les radiations ionisantes est encore mal compris.^{13,25,26} Le rôle de l'environnement semblerait avoir été exagéré, alors que celui de la génétique aurait été sous-estimé. Par exemple, on observe une incidence supérieure de leucémie chez les individus atteints de la trisomie 21, du syndrome de Bloom, de l'anémie de Fanconi, de la neurofibromatose et de l'ataxie télangiectique, suggérant une contribution génétique.²⁷ Plusieurs études réalisées chez des jumeaux monozygotiques supportent l'importance d'une contribution génétique dans le développement de la LLA pré-B.²⁸⁻³¹ L'histoire familiale de cancers ou de maladies auto-immunes n'influencerait pas le risque de développement de la LLA pré-B pédiatrique chez l'enfant.³²⁻³⁴ Certains cas familiaux de leucémie ont été rapportés, mais ils semblent extrêmement rares.³⁵

Une des caractéristiques des leucémies est la présence d'anomalies chromosomiques spécifiques, dont les plus fréquentes sont t(1;19), t(9;22), t(4;11), t(8;14), t(11;14) et t(12;21). La caractérisation moléculaire des séquences d'ADN présentes aux niveaux des points de bris de ces aberrations chromosomiques a permis l'identification de plusieurs gènes, surtout des oncogènes, dont l'activation joue un rôle dans la genèse de la LLA pré-B pédiatrique. Environ 75% des patients atteints de la LLA pré-B montrent un de ces réarrangements récurrents.⁶

Ce chapitre présentera les altérations génomiques et génétiques les plus représentées chez les enfants atteints de la LLA pré-B (*Tableau II*).

Tableau II. Fréquence, pronostic et survie sans événement sur cinq ans des altérations génomiques et génétiques retrouvées chez la LLA pré-B pédiatrique.

Altération	Fréquence (%)	Pronostic	SSE sur 5 ans (%)
t(12;21)(p13;q22) ETV6-AML1	15-25	Excellent	80-85
Hyperdiploïdie	20-30	Excellent	85-95
Surexpression de CRLF2	7	Mauvais	N/D
t(1;19)(q23;p13) E2A-PBX1	6	Excellent	80-85
t(9;22)(q34;q11.2) BCR-ABL1	4	Mauvais	80-90 (sur 3 ans)
t(4;11)(q21;q23) MLL-AF4	2	Mauvais	30-40
Amplification intra-chromosomique du chromosome 21	2	Mauvais	30-40
Hypodiploïdie	2	Mauvais	35-40
t(8;14)(q23;q32.3)	2	Favorable	75-85
Non caractérisée	25	N/A	N/A

SSE; Survie sans événement : N/A; Non applicable : N/D; Non disponible. Les données sont tirées de la revue de littérature de Pui C.H. et al.⁶

1.3.2. La translocation chromosomique t(12;21)(p13;q22) ETV6-AML1.

La translocation chromosomique t(12;21)(p13;q22) ETV6-AML1, également connue sous le nom de TEL-AML1 ou ETV6-RUNX1, est présente chez environ 25% des LLA pré-B pédiatriques.⁶ Cette translocation chromosomique est une des altérations génétiques les plus fréquentes de la LLA pré-B pédiatrique. Ses caractéristiques génétiques et fonctionnelles seront présentées plus tard dans l'introduction (*section 1.4.*).

1.3.3. L'hyperdiploïdie.

L'hyperdiploïdie, présente chez environ 25% des LLA pré-B pédiatriques, est caractérisée par la présence de 51-67 chromosomes dans le lymphocyte pré-B leucémique.³⁶ Cette altération génétique, rarement observée chez la LLA pré-B adulte, a un pic d'incidence de 2-4 ans.^{36,37} L'origine prénatale de la LLA pré-B hyperdiploïde est confirmée, même si son étiologie est inconnue.^{28,38}

L'hyperdiploïdie a été associée à des trisomies des chromosomes 4 et 10 et à des mutations activatrices de la GTPase Ras et du récepteur tyrosine kinase hématopoïétique FLT3.³⁹⁻⁴¹ Des inhibiteurs spécifiques à l'activité de FLT3 nuiraient à la survie des lymphocytes pré-B leucémiques via une activation des mécanismes pro-apoptotiques.⁴² Ces inhibiteurs permettraient également de cibler les lymphocytes pré-B leucémiques qui présentent un niveau élevé d'expression de FLT3.^{43,44}

1.3.4. La surexpression de CRLF2.

Les mutations dans le gène du récepteur transmembranaire *CRLF2* sont présentes chez 7% des LLA pré-B pédiatriques.⁴⁵ Ces mutations entraînent une augmentation de l'expression et/ou de la stabilité de *CRLF2*.^{6,45} Elles sont également associées à des mutations activatrices dans le gène codant pour la tyrosine kinase JAK2, ce qui favoriserait la prolifération des lymphocytes pré-B leucémiques en l'absence de facteurs de croissance.⁴⁵

1.3.5. La translocation chromosomique t(1;19)(q23;p13) E2A-PBX1.

La translocation chromosomique t(1;19)(q23;p13) E2A-PBX1, également connue sous le nom de TCF3-PBX1, est présente chez 2-6% des LLA pré-B pédiatriques.⁶

Son origine est postnatale, contrairement à d'autres translocations chromosomiques.⁴⁶ Le gène de fusion E2A-PBX1 entraîne l'expression d'une chimère transcriptionnelle qui est responsable de la surexpression de Wnt16.⁴⁷ La protéine Wnt16 présente une activité anti-apoptotique qui favorise la survie des lymphocytes pré-B leucémiques. La chimère E2A-PBX1 est également associée à une surexpression de ZAP70, une tyrosine kinase essentielle à la transition de progéniteur à précurseur durant la différenciation lymphoïde B.^{48,49}

Comparativement au gène de fusion BCR-ABL, E2A-PBX1 favorise la prise de greffe des cellules leucémiques humaines chez des souris SCID dépourvues de cellules B et T.⁵⁰ De plus, la distribution de lésions macroscopiques (ex. hépatomégalie, splénomégalie) et microscopiques (ex. moelle osseuse, muscles squelettiques et thymus) est supérieure chez les souris SCID transplantées avec des cellules leucémiques humaines E2A-PBX1.⁵⁰ Ces résultats proposent que les mécanismes moléculaires responsables de la progression de la LLA pré-B varient selon la nature de l'altération génétique. D'ailleurs, le type d'altération génétique est un élément considéré lors de la détermination du pronostic de la LLA pré-B de l'enfant.^{6,51}

1.3.6. La translocation chromosomique t(9;22)(q34;q11.2) BCR-ABL1.

La translocation chromosomique t(9;22)(q34;q11.2) BCR-ABL1, également connue sous le nom du chromosome de Philadelphie, est présente chez 2-4% des enfants atteints de la LLA pré-B.⁶ Des études chez des jumeaux monozygotiques proposent son origine prénatale chez la majorité des cas étudiés.²⁸ La t(9;22) entraîne l'expression d'un gène de fusion, BCR-ABL1, formé de régions définies

entre le gène *BCR* et la tyrosine kinase *ABL1*. La chimère BCR-ABL1 agit à titre d'oncogène et son activité kinase inhibe la cascade signalétique liée au récepteur membranaire pré-B.⁵² Ceci entraîne un arrêt de la différenciation cellulaire des lymphocytes pré-B. Des études réalisées avec des souris transgéniques montrent que la perte d'expression de la chimère BCR-ABL1 renverse le phénotype de la leucémie.⁵³ D'ailleurs, le développement d'inhibiteurs spécifiques à l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL1 comme l'imatinib mesylate a permis d'améliorer le pronostic de la LLA pré-B pédiatrique t(9;22)+.^{54,55}

Des études génétiques ont identifié deux événements génétiques fréquents chez la LLA pré-B pédiatrique t(9;22)+. Premièrement, la délétion du gène *Ikaros*, un facteur de transcription impliqué dans le développement lymphocytaire, entraîne une diminution de l'expression d'*Ikaros* et/ou l'expression d'*Ik6*, une forme dominante-négative de *Ikaros* formé via un épissage aberrant.^{56,57} L'haploinsuffisance du gène *Ikaros* dans un modèle murin de la LLA pré-B t(9;22)+ accélère le développement de la leucémie.⁵⁸ Deuxièmement, il y a la délétion hémizygote du gène *Pax5*, un facteur de transcription également impliqué dans le développement lymphocytaire. *Pax5* est exprimé à travers les stages successifs de la différenciation hématopoïétique des lymphocytes B (progéniteur B, précurseur B, B mature).⁵⁹ Ceci entraîne un arrêt de la différenciation cellulaire, un phénomène avantageux pour la prolifération du lymphocyte pré-B leucémique.

1.3.7. La translocation chromosomique t(4;11)(q21;q23) MLL-AF4.

La translocation chromosomique t(4;11)(q21;q23) MLL-AF4 est présente chez 1-2% des LLA pré-B pédiatriques.⁶ Cette translocation mène à l'expression de la

chimère transcriptionnelle MLL-AF4.³¹ Des études chez des jumeaux monozygotiques montrent un haut taux de concordance de la LLA pré-B pédiatrique t(4;11)+, ce qui démontre son origine prénatale.⁶⁰ De plus, puisque la LLA pré-B pédiatrique t(4;11)+ a un pic d'incidence de 0-1 an, il est fort probable que la leucémogénèse soit initiée durant le développement embryonnaire.

Des études chez des modèles murins suggèrent que l'expression de la chimère transcriptionnelle MLL-AF4 contribue à la leucémogénèse pédiatrique, mais sa présence seule n'explique pas la courte latence de la LLA pré-B pédiatrique.^{61,62} Des études récentes proposent que le patron de méthylation de l'ADN contribuerait à la pathogénèse de la LLA pré-B pédiatrique t(4;11)+.^{63,64} Les facteurs environnementaux étant responsables des changements épigénétiques interindividuels, l'environnement semble être une composante impliquée dans le développement de la LLA pré-B pédiatrique.⁶⁵

1.3.8. L'amplification intra-chromosomique du chromosome 21.

L'amplification intra-chromosomique du chromosome 21 compte pour environ 2% des LLA pré-B pédiatriques, mais elle est plus présente chez les enfants âgés de 5 ans et plus et chez les adolescents.⁶⁶ D'ailleurs, les enfants atteints du syndrome héréditaire de Down présentent un risque de 10-20 fois supérieur au développement de la LLA pré-B comparativement aux enfants non atteints de la trisomie 21.⁶⁷ Les LLA pré-B associées à une amplification intra-chromosomique du chromosome 21 se développent plus tardivement et, par le fait même, sont associées à un mauvais pronostic.⁶⁸

1.3.9. L'hypodiploïdie.

L'hypodiploïdie, présente chez environ 2% des LLA pré-B pédiatriques, se distingue par la présence de 44 chromosomes ou moins chez le lymphocyte pré-B leucémique.⁶ Les monosomies des chromosomes 7, 9, 13, X et Y sont les plus fréquentes.⁶⁹ L'étiologie de la LLA pré-B hypodiploïde est également inconnue.^{6,31}

1.3.10. La translocation chromosomique t(8;14)(q23;q32.3).

Les translocations chromosomiques impliquant le gène MYC comptent pour environ 2% des LLA pré-B pédiatriques.⁶ Dans le cas de la translocation t(8;14)(q23;q32.3), le locus de *MYC* est juxtaposé avec la région *enhancer* de l'immunoglobuline à chaîne longue.⁷⁰ Ceci entraîne une expression élevée de MYC chez ces patients leucémiques.⁷¹ MYC est un facteur de transcription essentiel au maintien de l'équilibre entre l'auto-renouvellement et la différenciation cellulaire des cellules souches hématopoïétiques.⁷² Il favorise également la différenciation lymphocytaire B de progéniteur à précurseur.⁷² Dans un modèle murin, la surexpression de MYC entraîne une inactivation de la voie biologique de p53, ce qui suffit au développement d'un lymphome.⁷³ De façon intéressante, la latence de la maladie est écourtée en présence du facteur de transcription ETV7, un oncogène de la famille Ets.^{73,74}

1.4. La translocation chromosomique t(12;21)(p13;q22) ETV6-AML1.

1.4.1. Origine prénatale de la t(12;21)(p13;q22) ETV6-AML1.

Plusieurs études confirment que la translocation chromosomique t(12;21)(p13;q22) ETV6-AML1 a une origine prénatale. Chez des jumeaux monozygotiques diagnostiqués avec la LLA pré-B pédiatrique, la présence de la t(12;21) suggère que le clone pré-leucémique a été partagé durant la vie embryonnaire, probablement par l'intermédiaire du placenta.^{75,76}

La t(12;21) est détectée sur la carte de Guthrie d'environ 75% des enfants atteints de la LLA pré-B t(12;21)+.⁷⁷⁻⁸⁰ L'utilisation de la carte de Guthrie, un outil clinique utilisé pour détecter les maladies génétiques héréditaires rares, a permis de montrer la présence de la t(12;21) chez les nouveaux-nés. Il est également intéressant de noter que 1-10% des nouveaux-nés sont porteurs de la t(12;21), ce qui représente une fréquence environ 100 fois plus élevée que celle des enfants développant la LLA pré-B pédiatrique t(12;21)+.¹⁷ La formation du gène de fusion ETV6-AML1 serait donc un événement génétique relativement fréquent durant la vie embryonnaire.

1.4.2. ETV6-AML1 ne suffit pas au développement de la LLA pré-B pédiatrique.

La translocation chromosomique t(12;21)(p13;q22) ETV6-AML1 entraîne l'expression du gène de fusion ETV6-AML1. ETV6-AML1 est une chimère transcriptionnelle dont le rôle au niveau de la régulation transcriptionnelle sera

décrit dans les prochaines pages (*section 1.6.*). Le clone pré-leucémique exprimant le gène de fusion ETV6-AML1 possède des marqueurs de surface spécifiques aux cellules souches hématopoïétiques (CD34+) et aux cellules lymphoïdes pré-B (CD19+ et CD38-).⁸¹⁻⁸³ Après la naissance, le clone pré-leucémique t(12;21) peut demeurer en latence durant plusieurs années dans la moelle osseuse.⁸⁴

AML1 est un facteur de transcription impliqué durant l'hématopoïèse fœtale. L'inactivation du gène AML1 durant la vie embryonnaire entraîne une hémorragie du système nerveux central et un arrêt de l'hématopoïèse fœtale chez des souris transgéniques.^{85,86} Durant la vie adulte, AML1 agit comme régulateur positif de la maturation des mégakaryocytes et de la différenciation lymphoïde B.⁸⁷ Ainsi, suite à la découverte de la chimère ETV6-AML1, plusieurs équipes de recherche ont tenté d'élucider son rôle biologique par des études utilisant des modèles cellulaires et animaux. En 2001, Andreasson et al. ont développé un modèle murin exprimant le gène de fusion ETV6-AML1 durant la vie embryonnaire.⁸⁸ Son expression était sous le contrôle du promoteur et *enhancer* de l'immunoglobuline à chaîne longue, ce qui permettait de cibler l'expression aux lignées lymphoïdes B.⁸⁹ Les souris ont été examinées sur une période de 24 mois, et aucune d'entre elles n'a présenté un phénotype de LLA pré-B. De plus, leurs études dans des lignées cellulaires montrent que la chimère ETV6-AML1 ne favorise pas la prolifération cellulaire en l'absence de facteurs de croissances. D'autres gènes de fusion impliquant ETV6, dont la chimère ETV6-JAK2 présent dans plusieurs types de leucémies, peuvent favoriser la prolifération cellulaire en l'absence de facteurs de croissance.⁹⁰ Ceci est le résultat d'une activité kinase constitutive de la chimère ETV6-JAK2.⁹¹

L'expression de la protéine chimérique ETV6-JAK2 dans les lymphocytes pré-B est donc favorable à l'initiation et à la progression des processus leucémogéniques *in vivo*.^{90,91}

En 2002, Bernardin et al. ont utilisé une infection rétrovirale pour exprimer la chimère ETV6-AML1 dans une population enrichie en cellules souches hématopoïétiques murines isolées de la moelle osseuse de souris C57BL/6.⁹² Ces cellules ont été injectées dans des souris et le développement de la maladie a été suivi sur une période de 24 mois. La proportion de souris qui développait une LLA pré-B suite à l'expression de la chimère ETV6-AML1 était trop faible pour confirmer son rôle dans l'initiation de la LLA pré-B pédiatrique (2/9). De plus, la latence de la pathologie était trop longue comparativement à celle observée chez les enfants. Par contre, lorsque l'expression de la chimère ETV6-AML1 était accompagnée de la perte du locus *CDKN2A* et *CDKN2D*, l'incidence de la leucémie augmentait (6/8).⁹² *CDKN2A* et *CDKN2D* sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire ainsi que dans la réponse biologique médiée par p53.^{93,94}

1.4.3. ETV6-AML1 inhibe la différenciation des lymphocytes B.

En 2004, Morrow et al. ont utilisé une infection rétrovirale pour insérer la chimère ETV6-AML1 dans des cellules progénitrices hématopoïétiques du foie fœtal.⁹⁵ Ils ont constaté que l'expression de la chimère ETV6-AML1 augmentait l'auto-renouvellement des lymphocytes pré-B *in vivo*. Ces résultats furent confirmés par une étude parallèle de Tsuzuki et al. en 2004, dans laquelle ils ont également utilisé une infection rétrovirale pour insérer la chimère ETV6-AML1 dans des cellules souches hématopoïétiques murines.⁹⁶ Ils ont observé que l'expression de

la chimère ETV6-AML1 inhibait la différenciation des lymphocytes B *in vivo*. Ces deux études ont permis d'attribuer un nouveau rôle à la chimère ETV6-AML1 durant l'inhibition de la différenciation des lymphocytes B. Ainsi, la translocation chromosomique t(12;21)(p13;q22) ETV6-AML1 favorise la latence du clone pré-leucémique dans la moelle osseuse.⁸⁴ Le clone pré-leucémique étant bloqué à un stade de différenciation hématopoïétique, des événements génétiques supplémentaires seront nécessaires pour favoriser sa transformation en cellule leucémique et activer ses mécanismes de prolifération cellulaire.⁹⁷

1.4.4. ETV6-AML1 favorise l'auto-renouvellement des cellules pré-leucémiques.

En 2005, une étude de Fischer et al. montre que l'expression de la chimère ETV6-AML1 augmente la capacité d'auto-renouvellement des cellules pré-leucémiques chez la souris.⁹⁸ Cette étude utilisait un modèle de souris similaire à celui décrit par Tsuzuki et al.⁹⁶ La capacité d'autorenouvellement est un des critères déterminant le phénotype d'une cellule souche. Elle contribue au maintien du nombre de cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse.⁹⁹

1.4.5. ETV6-AML1 désensibilise la cellule pré-leucémique aux signaux de TGF β .

En 2009, Ford et al. ont montré que l'expression de la chimère ETV6-AML1 entraîne une désensibilisation de la cellule pré-leucémique aux signaux antiprolifératifs de TGF β .¹⁰⁰ Cette cytokine est sécrétée par les lymphocytes T activés par une infection virale. Ainsi, lors d'une réponse immunitaire, la survie de

la cellule pré-leucémique t(12;21)+ serait avantagée par rapport à d'autres cellules hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse. Par contre, la cytokine TGF β ne permet pas de mettre fin à la phase de latence de la cellule pré-leucémique.¹⁰⁰

1.4.6. ETV6-AML1 participerait à la phase de latence de la LLA pré-B pédiatrique.

Les études sur la chimère ETV6-AML1 confirment que sa présence seule ne suffit pas au développement de la LLA pré-B (*Figure 2*). La chimère ETV6-AML1 ne permet pas d'augmenter le taux de prolifération en absence de facteurs de croissance. Pourtant, les cellules cancéreuses présentent une prolifération accélérée dans un environnement appauvri en facteurs de croissance, nutriments et oxygène.¹⁰¹ Par contre, ETV6-AML1 favorise la phase de latence du clone pré-leucémique en inhibant la différenciation lymphocytaire B. Il entraîne également une désensibilisation aux signaux antiprolifératifs et une augmentation des capacités d'autorenouvellement de la cellule pré-leucémique.^{96,98,100} Ainsi, ETV6-AML1 participerait davantage à la phase de latence de la leucémogénèse pédiatrique.

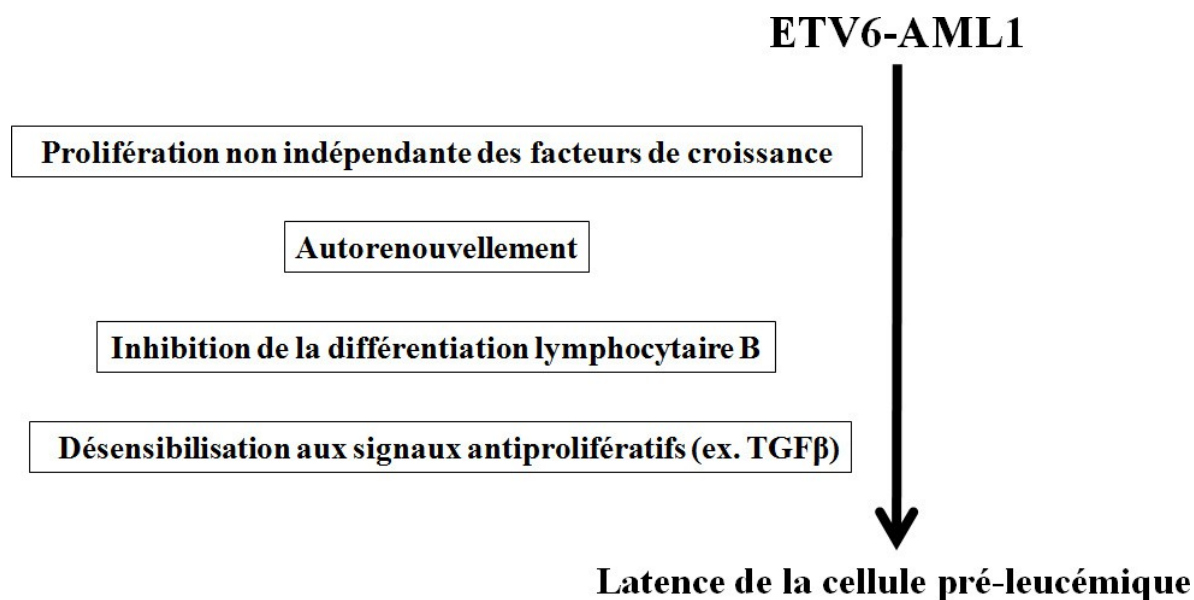


Figure 2. La protéine chimérique ETV6-AML1 participe à la phase de latence de la LLA pré-B pédiatrique. Ceci est un résumé des propriétés de la chimère ETV6-AML1 présentées à la section 1.4.

1.5. Les délétions génomiques associées à la translocation chromosomique t(12;21)(p13;q22) ETV6-AML1.

En 2011, van der Weyden et al. ont développé un modèle de souris où l'expression de la chimère ETV6-AML1 est dirigée par le promoteur endogène du gène ETV6.¹⁰² Ils ont également inséré un variant hyperactif de la SB transposase suite au gène de fusion ETV6-AML1, dont l'expression était contrôlée par un IRES. Le gène de fusion ETV6-AML1 et de la SB transposase a été inséré dans des cellules souches embryonnaires murines pour permettre son expression durant la vie embryonnaire. Sur une période de 3 mois, environ 20% des souris exprimant le gène de fusion ETV6-AML1 et la SB transposase ont développé une LLA pré-B. Comparativement aux études précédentes, la fréquence plus élevée de

développement de la LLA pré-B s'explique par la création de mutations additionnelles par la SB transposase. Malheureusement, cette étude n'a pas permis de faire un chevauchement intéressant avec les altérations génomiques fréquemment retrouvées chez la LLA pré-B pédiatrique dont les délétions génomiques de *CDKN2A*, *Pax5*, *del(q6)* et *ETV6*.

Aucune étude n'a réussi à démontrer que la présence seule du gène de fusion *ETV6-AML1* suffit à l'initiation de la leucémogénèse. Celle-ci requière donc la présence d'autres altérations génétiques afin d'initier le développement de la LLA pré-B pédiatrique. La pathogénèse moléculaire de la LLA est donc plus complexe que ce que l'on pensait initialement.

1.5.1. Les délétions génomiques de *CDKN2A/B*, *Pax5* et *del(q6)*.

Des études d'association génomique de type GWAS (« Genome Wide Association Study ») ont associé de nouvelles délétions génomiques à la LLA pré-B pédiatrique *t(12;21)+*. En 2010, Lilljebjörn et al. constatent quatre délétions génomiques accompagnatrices de la translocation chromosomique *t(12;21)(p13;q22)* *ETV6-AML1* : les gènes *CDKN2A/B*, *Pax5* et *ETV6* ainsi que le locus *del(q6)* contenant au moins 4 gènes.¹⁰³ Leur analyse d'arbre oncogénique sur 164 enfants atteints de la LLA pré-B *t(12;21)+* propose quatre différents enchaînements séquentiels (*Figure 3*). Le nombre d'événements génétiques varient de 2-6 suite à la délétion des gènes *CDKN2A/B* et *Pax5* et du locus *del(q6)*. Par contre, aucun événement génétique ne suivrait la délétion d'*ETV6* dans la LLA pré-B *t(12;21)+*. Ceci suggère que l'inactivation du facteur de transcription *ETV6* serait suffisante à l'initiation de la leucémogénèse pédiatrique. Les résultats de

cette étude ont également été confirmés chez les enfants présentant une rechute de la LLA pré-B t(12;21)+.⁸⁴

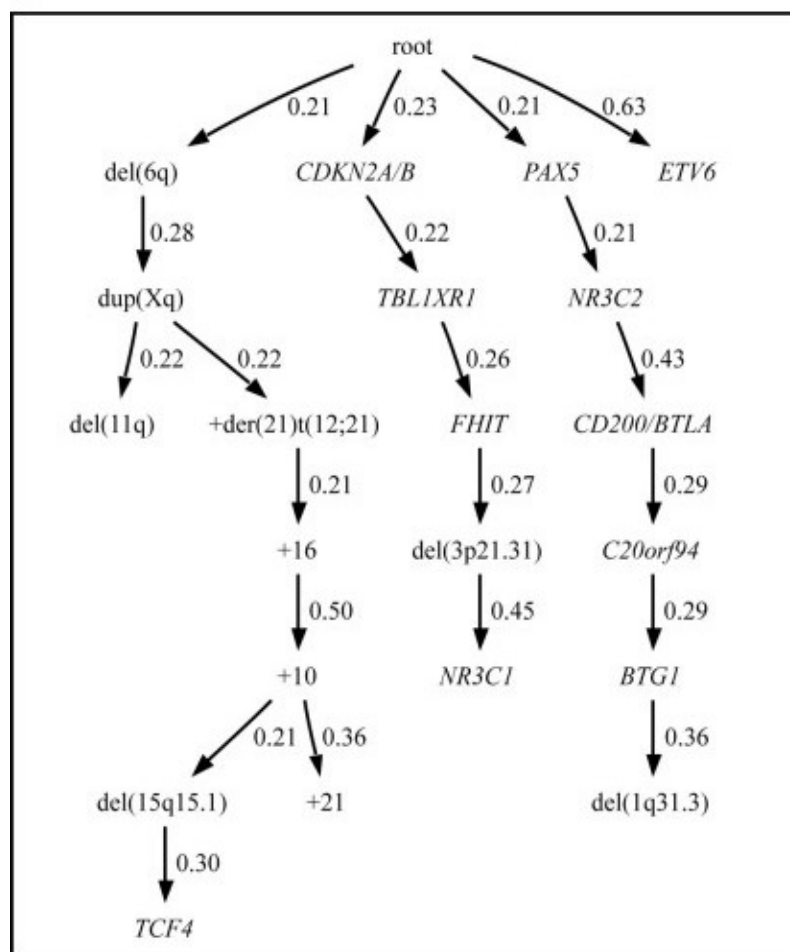


Figure 3 : Analyse de l'arbre oncogénétique des CNA de la LLA pré-B t(12;21) ETV6-AML1. Cette figure est tirée de l'étude de Lilljebjörn et al.¹⁰³ Chez 164 patients atteints de la LLA pré-B pédiatrique t(12;21)+, l'ordre des 21 CNA (« Copy number alteration ») est déterminé de façon non-aléatoire en utilisant la méthodologie de Brodeur et al.¹⁰⁴ La séquence des CNA est déterminée par les flèches et représente leur ordre hypothétique d'apparition durant le développement la LLA pré-B t(12;21)+. La probabilité pour une cellule d'acquérir un CNA est indiquée sur chaque flèche et dépend automatiquement de l'acquisition du ou des CNA précédents. Chaque racine correspond à un nouvel arbre oncogénique. Les délétions génomiques ETV6, CDKN2A/B, Pax5 et del(6q) sont près de la racine de l'arbre et constituent des chemins indépendants durant la leucémogénèse pédiatrique.

1.5.2. La délétion hémizygote du locus *ETV6*.

En 2002, Montpetit et al. ont construit une carte transcriptionnelle de la région chromosomique 12p12, située sur le bras court du chromosome 12.¹⁰⁵ Cette région génomique présente souvent une délétion hémizygote dans plusieurs tumeurs hématologiques dont la LLA pré-B pédiatrique. Leur étude a permis d'identifier huit unités transcriptionnelles présentes dans la région chromosomique 12p12. Cette étude a été suivie par une analyse d'expression de ces huit unités transcriptionnelles et a permis d'identifier le gène *ETV6* comme la cible principale de cette délétion hémizygote.¹⁰⁶ Dans une cohorte de patients atteints de la LLA pré-B, cette perte d'hétérozygoté sur le bras court du chromosome 12 était toujours accompagnée de la translocation t(12;21) *ETV6*-*AML1*.^{106,107} Ceci entraînait la perte d'expression permanente d'*ETV6* dans les lymphocytes pré-B leucémiques. Ces résultats sont appuyés par une autre étude qui a mesuré les niveaux protéiques de la chimère *ETV6*-*AML1* et de *ETV6* chez des enfants atteints de la LLA pré-B.¹⁰⁸ Une étude comparative entre le matériel tumoral du premier diagnostic et de la rechute a également montré une délétion du locus *ETV6* chez les enfants atteints d'une LLA pré-B t(12;21)+.¹⁰⁹ En d'autres termes, le second allèle de *ETV6* (l'allèle non-transloqué) est souvent délété dans les patients possédant la translocation chromosomique t(12;21)(p13;q22) *ETV6*-*AML1*.

1.6. Le facteur de transcription ETV6.

1.6.1. ETV6 est un répresseur transcriptionnel de la famille Ets.

Le facteur de transcription ETV6 est un membre de la famille Ets. La famille Ets compte 29 membres connus qui sont conservés à travers l'évolution.¹¹⁰ ETV6 possède un homologue chez la mouche à fruit (*Drosophila melanogaster*) nommé YAN, ainsi qu'une forte homologie de séquence avec les facteurs de transcription ETS1 et ETS2.¹¹¹⁻¹¹² ETV6 est le seul membre de la famille Ets qui agit à titre de répresseur transcriptionnel.¹¹³

L'identification de ETV6, autrefois connu sous le nom de TEL, est le résultat de l'identification de la translocation chromosomique ETV6-PDGFR β t(5;12)(q133;p13) présente dans la leucémie myélomonocytaire chronique.¹¹⁴ On connaît maintenant plusieurs régions chromosomiques impliquant ETV6 dans des translocations qui mènent à la création de produits de fusion chimérique.¹¹⁵ Dans les leucémies, l'identité du partenaire de fusion est connue dans vingt de ces translocations (Figure 4A).¹¹⁵ Parmi ces translocations qui sont généralement rares, la translocation chromosomique t(12;21)(p13;q22) ETV6-AML1 est observée chez environ 25% des enfants atteints de la LLA pré-B (*section 1.3.*). La t(12;21) fusionne le domaine PNT de ETV6 avec le facteur de transcription AML1 (RUNX1 ou CBFA2), produisant la chimère ETV6-AML1 (Figure 4B).¹¹⁵ Ceci entraîne une répression de la transcription des gènes ciblés par le facteur de transcription AML1.¹¹⁶ Il est probable que cette modification du patron d'expression génétique entraînée par ETV6-AML1 contribue à la leucémogénèse, mais comme mentionné

précédemment, ceci ne suffit pas au développement complet de la LLA pré-B pédiatrique.

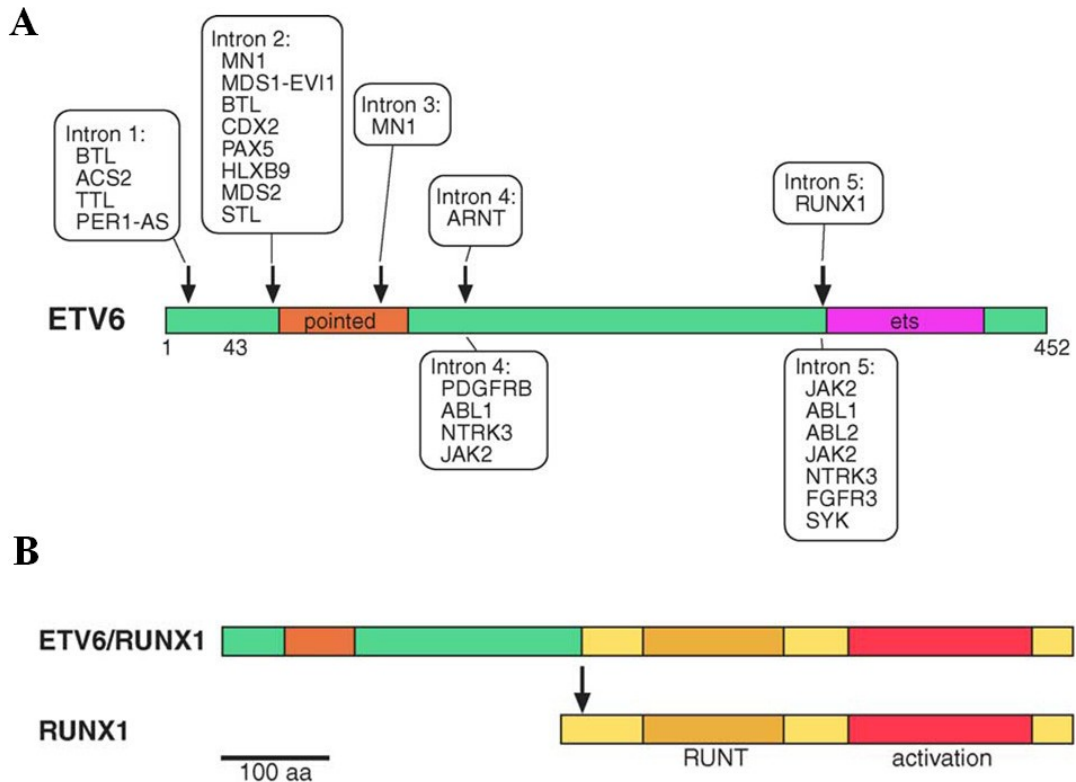


Figure 4. Le facteur de transcription ETV6 et ses partenaires de translocation chromosomiques dans la leucémie. (A) ETV6 et ses domaines fonctionnels, Pointed/PNT et ETS, sont présentés. Les partenaires de fusion d'ETV6 et les points de cassure sont également indiqués. (B) Le gène de fusion ETV6-AML1, dénoté ETV6/RUNX1. Cette figure est adaptée d'une revue de littérature de Bohlander et al.¹¹⁵

Une analyse génomique du locus d'ETV6 a permis de déceler l'organisation du gène.¹¹² ETV6 se situe sur le bras court du chromosome 12 et est composé de 8 exons entrecoupés de 7 introns. Le promoteur de ETV6 ne possède pas de boîte TATA ou CAAT ce qui pourrait expliquer son expression ubiquitaire chez la souris et l'humain.^{112,117} D'après les séquences protéiques publiées dans la base de données NCBI (National Center for Biology Information), le pourcentage d'homologie de ETV6 entre la souris et l'humain est 89%. La traduction de l'ARNm codant pour ETV6 est dirigée par deux sites d'initiation de la traduction (ATG1 et ATG43).¹¹⁸ Ceci entraîne l'expression de deux isoformes protéiques de ETV6 qui peuvent réprimer la transcription.¹¹³ ETV6 possède deux domaines fonctionnels qui sont caractéristiques de la famille Ets: le domaine PNT et le domaine ETS (Figure 5). ETV6 possède également un domaine central, situé entre les domaines PNT et ETS, qui est responsable du recrutement de la machinerie de répression transcriptionnelle composée de mSin3a, N-CoR, SMRT, HDAC3 et HDAC9.¹¹⁹⁻¹²² Le domaine de répression central peut également recruter la protéine adaptatrice Grb2.¹²³ Le signal de localisation nucléaire de ETV6 n'est pas identifié, mais une étude suggère qu'il est situé entre les acides aminés 332 et 452.¹²⁴

L'inactivation du facteur de transcription ETV6 n'est pas exclusive à la LLA pré-B pédiatrique. Certaines études montrent la présence de mutations inactivatrices dans le gène *ETV6*, notamment dans les LLA de type pré-T, les LMA, les tumeurs du sein et les tumeurs de la prostate.¹²⁵⁻¹²⁸ Ainsi, l'activité du facteur de transcription ETV6 est fréquemment compromise dans les leucémies et dans certaines tumeurs solides.

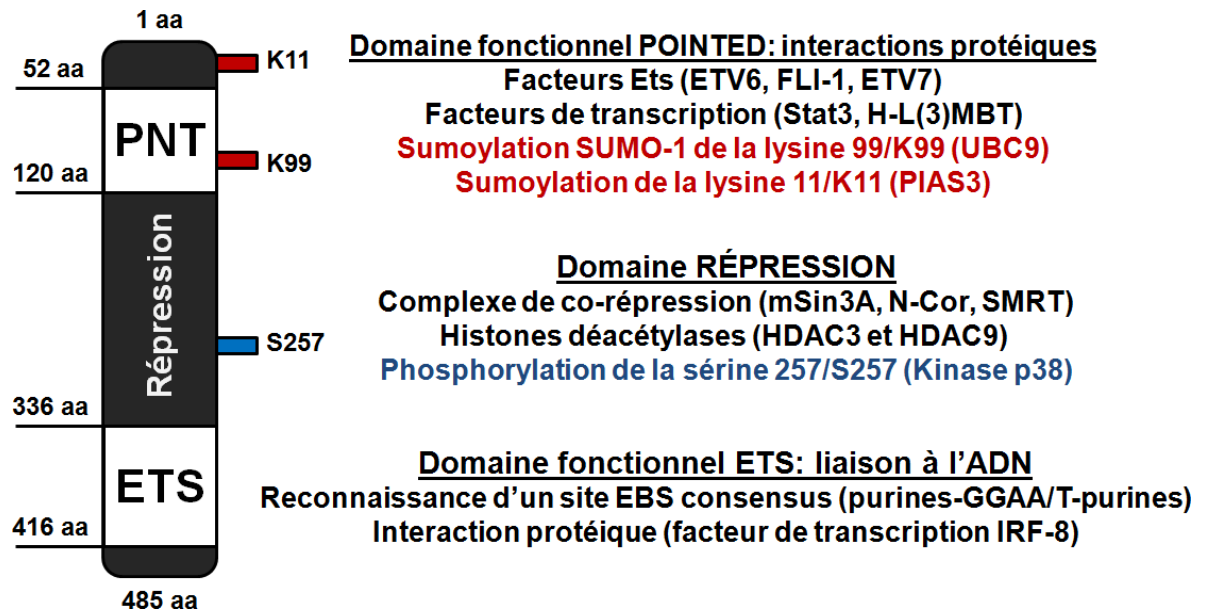


Figure 5. Le facteur de transcription ETV6 et ses domaines fonctionnels. Le domaine fonctionnel d'interaction protéique (PNT) se situe entre les acides aminés/aa 52 et 120, alors que le domaine fonctionnel de liaison à l'ADN (ETS) se situe entre les acides aminés 336 et 416. Le domaine de répression est situé entre les domaines PNT et ETS. Les partenaires d'interactions protéiques du facteur de transcription ETV6 sont indiqués, ainsi que les modifications post-traductionnelles connues.

1.6.2. Le domaine PNT est impliqué dans les interactions protéiques.

1.6.2.1. Homodimérisation du répresseur transcriptionnel ETV6.

La protéine ETV6 possède un domaine fonctionnel PNT responsable des interactions protéiques. Le domaine PNT participe à l'homodimérisation du facteur de transcription ETV6, ce qui favorise l'efficacité de la répression transcriptionnelle médiée par ETV6 sur un de ses gènes cibles. Cette propriété d'homodimérisation fut confirmée par des expériences de co-immunoprécipitation dans des cellules humaines HeLa exprimant une protéine mutée ou tronquée du facteur de

transcription ETV6.¹²⁹ Ces résultats furent ensuite confirmés avec un système de levure double-hybride dont la librairie était construite à partir de cellules murines hématopoïétiques pluripotentes EML-1.¹³⁰

D'autres membres de la famille Ets possèdent également un domaine fonctionnel PNT: ETS1, ETS2, FLI-1, etc. Chaque facteur de transcription Ets a développé un interface unique sur son domaine fonctionnel PNT, ce qui permet de créer des interactions protéiques uniques à chaque membre de la famille Ets.¹³¹

1.6.2.2. Hétérodimérisation avec les facteurs Ets : FLI-1, ETV7.

ETV6 interagit également avec d'autres facteurs de transcription de la famille Ets. Le domaine PNT est impliqué dans la reconnaissance du facteur de transcription FLI-1, dont l'expression est spécifique au système hématopoïétique.¹²⁹ L'interaction entre ETV6 et FLI-1 nuit à la régulation transcriptionnelle médiée par FLI-1 sur les promoteurs de GPIb α et GPIX.¹³² Ceci inhibe la formation du phénotype de mégacaryocyte induit par le facteur de transcription Ets FLI-1.¹³²

ETV6 possède un homologue nommé ETV7 dont l'expression est également restreinte, comme FLI-1, aux tissus hématopoïétiques.¹³³ Cette interaction a été démontrée par une co-immunoprécipitation des protéines ETV6 et ETV7 dans les cellules humaines HeLa. Même si les données génétiques de la LLA pré-B pédiatrique suggèrent que ETV6 agit comme gène suppresseur de tumeur, le facteur de transcription ETV7 agirait à titre d'oncogène.⁷⁴

1.6.2.3. ETV6 interagit avec le facteur de transcription STAT3.

L'activité du facteur de transcription STAT3 est contrôlée par des récepteurs tyrosines kinases et des kinases cytoplasmiques. Son activité est essentielle au pouvoir oncogénique de certains gènes de fusion dont ETV6-JAK2.¹³⁴ Le domaine PNT du facteur de transcription ETV6 est impliqué dans une interaction protéique avec STAT3, ce qui entraîne le recrutement du complexe de co-répression mSin3A/N-CoR/SMRT/HDAC. La réponse transcriptionnelle médiée par STAT3 est alors inhibée.¹³⁵ STAT3 peut agir à titre d'oncogène en participant à la suppression de la réponse immunitaire contre la cellule tumorale.¹³⁶

1.6.2.4. ETV6 et H-L(3)MBT interagissent.

H-L(3)MBT est un gène suppresseur de tumeur qui agit comme répresseur transcriptionnel. Son interaction avec le répresseur transcriptionnel ETV6 requiert le domaine fonctionnel PNT.¹³⁷ La répression transcriptionnelle médiée par H-L(3)MBT est histone déacétylase indépendante.¹³⁷ Cette propriété pourrait être utilisée par ETV6 pour réprimer la transcription de ses gènes cibles.

1.6.3. Le domaine ETS est responsable de la liaison à l'ADN.

ETV6 possède un autre domaine fonctionnel responsable de la liaison à l'ADN: le domaine ETS. Cette région située du côté C-terminal de la protéine ETV6 est responsable de la reconnaissance d'une séquence d'ADN de type purines-GGAA/T-purines. Cette séquence est nommée le site EBS pour « Ets-binding site ».¹³⁸ Le domaine ETS d'ETV6 est également impliqué dans la localisation nucléaire d'ETV6.¹²⁴

Le facteur de transcription IRF8, ou ICSBP, est impliqué dans la réponse transcriptionnelle médiée par l'interféron-gamma (IFN- γ). Suite à une stimulation à l'IFN- γ , IRF8 peut interagir avec le facteur de transcription Ets PU.1 pour activer la transcription de ses gènes cibles.¹³⁹ ETV6 peut également interagir avec le facteur de transcription IRF8 via son domaine fonctionnel ETS. Ceci entraîne une répression de la transcription des gènes cibles de IRF8.¹³⁹ D'ailleurs, une étude récente propose que l'interaction ETV6-ICSBP réprime la transcription dans une région du promoteur proximal du gène Gas2.¹⁴⁰ Cette étude montre le recrutement de ICSBP dans un élément de régulation génétique du promoteur proximal de Gas2, mais ne permet pas de confirmer la présence de ETV6 dans le promoteur endogène.

1.6.4. Les modifications post-traductionnelles du répresseur transcriptionnel ETV6.

UBC9 est une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine. L'utilisation d'un système de levure double-hybride a permis de déceler une interaction protéique entre le répresseur transcriptionnel ETV6 et l'enzyme de conjugaison UBC9.¹⁴¹ UBC9 permet l'attachement d'une protéine « ubiquitin-like » nommée SUMO-1 à la lysine 99 du répresseur transcriptionnel ETV6, ce qui entraîne séquestration dans des foci nucléaires et son exportation nucléaire.^{142,143} L'interaction protéique entre ETV6 et SUMO-1 a été confirmée par co-immunoprécipitation des complexes protéiques dans des cellules humaines COS-7.¹⁴² De façon similaire, la phosphorylation de la sérine 257 du répresseur transcriptionnel ETV6 par la kinase p38 entraîne son exportation nucléaire.¹⁴³

Le répresseur transcriptionnel ETV6 peut également être sumoylé à sa lysine 11 par la protéine PIAS3.¹⁴⁴ Cette modification post-traductionnelle n'affecte pas la localisation nucléaire de ETV6, mais elle réduit son activité transcriptionnelle. Ceci a été confirmé par un essai luciférase avec un promoteur minimal contenant trois sites EBS consensus. L'isoforme alternatif d'ETV6 (ETV6m43), dépourvu de la lysine 11, démontre un pouvoir de répression supérieur comparativement à l'isoforme classique d'ETV6.^{118,144}

1.6.5. La fonction biologique de ETV6.

1.6.5.1. ETV6 est essentiel à l'hématopoïèse fœtale.

Le répresseur transcriptionnel ETV6 participe à l'hématopoïèse foetale. Des souris transgéniques ETV6^{-/-} présentent une angiogenèse défectueuse de la vésicule ombilicale et une mort des cellules mésenchymales et neurales, ce qui cause la mort embryonnaire aux jours E10.5-E11.5.¹¹⁷ ETV6 joue un rôle essentiel durant le développement hématopoïétique des lignées cellulaires formées dans la moelle osseuse et favorise la survie des cellules souches hématopoïétiques.^{145,146} Ceci est accompli par une inhibition de l'apoptose.¹⁴⁶ Dans la majorité des cas, lorsque la cellule souche hématopoïétique se commet à une lignée précise (ex. lymphoïde B), le facteur de transcription ETV6 ne participe pas à la maturation de la cellule.¹⁴⁶ Par contre, une étude sur des cellules humaines leucémiques UT7-GM suggère que ETV6 accélère la différenciation érythrocytaire et inhibe la maturation des mégakaryocytes.¹⁴⁷ Ces études montrent que ETV6 est un joueur important durant les premières étapes du développement hématopoïétique, et proposent également que le rôle biologique de ETV6 dépendrait du contexte cellulaire.

La présence de VEGFA, un facteur de croissance vasculaire des cellules endothéliales, favorise l'implantation du programme hématopoïétique durant la vie embryonnaire murine.¹⁴⁸ L'expression du gène VEGFA est modulée de façon positive par le facteur de transcription ETV6.¹⁴⁸ Même si ETV6 agit à titre de répresseur transcriptionnel, il existe quelques situations où son expression module de façon positive l'expression d'un gène dont VEGFA et FLI-1.^{149,150} Par contre, ces études ne confirment pas que cet effet provient de la régulation transcriptionnelle médiée par ETV6.

1.6.5.2. ETV6 est un régulateur négatif de la survie cellulaire.

Chez des cellules myéloïdes murines 32Dcl3, ETV6 active la voie intrinsèque mitochondriale de l'apoptose via l'activation de p53.¹⁵¹ Le répresseur transcriptionnel ETV6 peut également inhiber la prolifération cellulaire induite par l'interleukine 3 et induire un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire.^{151,152}

ETV6 semble donc agir comme gène suppresseur de tumeur. ETV6 étant un répresseur transcriptionnel, il est probable que son rôle fonctionnel soit médié par la régulation de l'expression de ses cibles transcriptionnelles. Malheureusement, très peu d'études se sont intéressées au rôle des cibles transcriptionnelles de ETV6 durant le développement tumoral.^{153,154} De plus, ces études n'ont pas été réalisées dans le contexte cellulaire ou physiologique de la LLA pré-B pédiatrique.

1.6.6. Les cibles transcriptionnelles du facteur de transcription ETV6.

Des études de régulation transcriptionnelle ont mené à l'identification de cinq cibles transcriptionnelle d'ETV6 : *MCSFR* (*macrophage colony-stimulating factor receptor*), *Gplba* (*platelet glycoprotein-Ib α*), *GpIX* (*platelet glycoprotein-IX*), *stromelysin-1/MMP-3* (*matrix metalloprotein-3*) et la protéine anti-apoptotique *BCL-X_L*.^{130,153-155}

1.6.6.1. *MCSFR*, *Gplba* et *GpIX*: cibles transcriptionnelles indirectes de ETV6.

Des essais de gène rapporteur ont été réalisés dans des cellules murines embryonnaires de fibroblastes NIH 3T3. ETV6 seul ne modifiait pas l'activité du promoteur basal du gène *MCSFR*. Par contre, ETV6 inhibait l'activation transcriptionnelle du promoteur basal de *MCSFR* par les facteurs de transcription CBFA2B et C/EBP α .¹⁵⁵ Cette étude n'a pas permis de montrer que ETV6 occupe le promoteur proximal de *MCSFR*, mais propose que les sites de liaison à l'ADN de CBFA2B et C/EBP α sont nécessaires à la répression transcriptionnelle médiée par ETV6.

Des essais de gène rapporteur dans les cellules érythroleucémiques K552 montrent que le facteur de transcription Ets FLI-1 active la transcription régulée par le promoteur proximal des gènes *Gplba* et *GpIX*.¹³⁰ Cette activation de la transcription est abolit par la surexpression du répresseur transcriptionnel ETV6.¹³⁰ Cette étude n'a pas permis de montrer la liaison de ETV6 sur le promoteur proximal des gènes *Gplba* et *GpIX*. Par contre, dans le cas du promoteur de *GpIX*,

l'activation transcriptionnelle par FLI-1 et la répression transcriptionnelle par ETV6 requièrent un site EBS consensus.

Les gènes *MCSFR*, *Gplba* et *GplX* sont donc des cibles transcriptionnelles indirectes de ETV6.^{132,155} Il faudra des expériences supplémentaires pour montrer la présence d'ETV6 sur le promoteur proximal de ces gènes.

1.6.6.2. *MMP-3* et *BCL-X_L*: cible transcriptionnelles directes de ETV6.

La régulation transcriptionnelle du promoteur basal de *MMP-3*, également connu sous le nom de *stromelysin-1*, est influencée par l'expression du facteur de transcription ETV6.¹⁵³ Dans les cellules murines embryonnaires fibroblastes NIH 3T3, la répression transcriptionnelle médiée par ETV6 requiert la présence de son domaine fonctionnel ETS et de deux sites EBS consensus. Ceci a été démontré par des essais de gène rapporteur et des expériences de retard sur gel avec la protéine ETV6. Cette étude est l'une des premières à proposer le rôle de gène suppresseur de tumeur à ETV6. Des études de prolifération cellulaire avec les cellules NIH 3T3 proposent qu'ETV6 nuise à la prolifération cellulaire induite par la GTPase Ras.¹⁵³

Le facteur anti-apoptotique *BCL-X_L* est une cible transcriptionnelle directe du facteur de transcription ETV6.¹⁵⁴ Ceci a été vérifié par des essais de gène rapporteur dans les cellules NIH 3T3, mais également des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine. La répression transcriptionnelle médiée par ETV6 se fait dans une région près du promoteur proximal et requiert la présence du domaine fonctionnel ETS. De plus, lorsque la lysine 99 est mutée en

arginine, le niveau de répression transcriptionnelle augmente grandement. Puisque cette mutation élimine l'interaction entre ETV6 et UBC9/SUMO-1, il est probable que la disponibilité du répresseur transcriptionnel au niveau du noyau soit augmentée.¹⁴² Cette étude fut la première à proposer l'implication de ETV6 dans l'apoptose. L'apoptose a été induite dans les cellules NIH 3T3 sur une période de 24 heures dans un milieu de culture pauvre en sérum, et le niveau d'apoptose a été quantifié par la distribution de micronucléi. La surexpression de ETV6 entraînait la formation d'environ 5 fois plus de micronucléi, comparativement au contrôle négatif ou à la surexpression de ETV6 dépourvu de son domaine fonctionnel ETS. Cette étude propose donc que la régulation transcriptionnelle médiée par ETV6 favorise l'induction de l'apoptose.

1.7. Hypothèse de recherche

La présence de la translocation chromosomique t(12;21)(p13;q22) ETV6-AML1 ne suffit pas au déclenchement de la leucémogénèse pédiatrique. Ceci a été confirmé par plusieurs études (*section 1.4.*). Des études génomiques montrent que la délétion hémizygote de *ETV6* est un événement fréquent chez la LLA pré-B pédiatrique t(12;21)+ (*section 1.5.*). Ceci mène à l'inactivation du facteur de transcription ETV6 chez plus de 70% de ces patients. Il faut donc considérer la possibilité que la perte de l'allèle non-transloqué de *ETV6* soit un événement clé menant à l'initiation de la leucémogénèse pédiatrique. Malgré les connaissances acquises sur le rôle de ETV6 au niveau de l'hématopoïèse adulte et foetale, nous possédons peu d'indices sur son implication dans la leucémogénèse pédiatrique (*section 1.6.4.*). L'hypothèse de recherche de ma thèse de doctorat est que l'inactivation du facteur de transcription ETV6, dans la LLA pré-B t(12;21)+, constitue un événement initiateur de la leucémogénèse pédiatrique via une dérégulation de l'expression de ses cibles transcriptionnelles.

1.8. But principal

Étant donné que l'on connaît peu de gènes ciblés par le répresseur transcriptionnel ETV6 (*section 1.6.5.*), le but principal de ce projet est de construire le réseau de régulation génétique associé à l'expression d'ETV6 et de mesurer son rôle dans le développement de la LLA pré-B de l'enfant. Pour tenter d'identifier de nouvelles cibles transcriptionnelles de ETV6, nous avons réalisé une étude à grande échelle combinant des expériences de micro-puces et de PCR quantitatif

chez des enfants atteints de la LLA pré-B pédiatrique.¹⁴⁹ Ceci a permis d'identifier cinq gènes dont l'expression est modulée par le facteur de transcription ETV6: *TP53*, *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* et *LUM*. Cette étude est le point de départ de ma thèse de doctorat.

1.9. Objectifs spécifiques

Pour cette étude, la sélection des gènes *TP53*, *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* et *LUM* s'est faite sur la base de leur implication potentielle dans la leucémogénèse pédiatrique via les études d'expression réalisées chez les enfants atteints de la LLA pré-B.¹⁴⁹ Leur fonction biologique n'a pas été prise en considération. Ainsi, la fonction biologique des gènes *TP53*, *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* et *LUM* sera discutée davantage dans la discussion (*chapitre 4*). Pour vérifier l'hypothèse de recherche et répondre au but principal de cette thèse de recherche, il faudra répondre à trois objectifs spécifiques.

1. Déterminer si les gènes *TP53*, *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* et *LUM* sont des cibles transcriptionnelles directes de ETV6.
2. Identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation transcriptionnelle médiée par ETV6 (ex. liaison à l'ADN, site de reconnaissance sur la chromatine, partenaires protéiques)

3. Mesurer l'impact de la dérégulation de l'expression de ces nouvelles cibles transcriptionnelles de ETV6 dans la leucémogenèse pédiatrique (ex. prolifération cellulaire, induction de l'apoptose, migration cellulaire).

Chapitre 2. Premier article.

P53 isoforms are regulated by ETV6, a transcriptional repressor deregulated in childhood leukemia.

Cet article sera soumis au journal EMBO J. en février 2012.

2.1. Présentation du premier article.

Notre équipe de recherche avait montré que l'expression du gène *TP53* était modulée par le facteur de transcription ETV6.¹⁴⁹ Ceci a été fait en combinant des expériences de micro-puces et de PCR quantitatif dans les cellules HeLa, dont les résultats furent confirmés chez des enfants atteints de la LLA pré-B. Quelques années auparavant, une étude menée par le groupe de recherche de Dr. David Lane a mené à l'identification des isoformes exprimés par le gène *TP53*.¹⁵⁶ L'expression des ces isoformes est régulée par l'utilisation de deux promoteurs distincts (classique et alternatif), de mécanismes d'épissage alternatif (α , β , γ) et de différents sites d'initiation de la traduction (ATG1, ATG40, ATG133 et ATG160). Ainsi, le gène *TP53* peut être exprimé en 6 transcrits et 12 protéines. Le promoteur classique de *TP53* (P1) est responsable de la transcription des transcrits p53 α , p53 β et p53 γ . Ceux-ci peuvent ensuite être traduits en six protéines : p53 α , p53 β , p53 γ , Δ 40p53 α , Δ 40p53 β et Δ 40p53 γ . Le promoteur alternatif de *TP53* (P2) est responsable de l'expression des transcrits Δ 133p53 α , Δ 133p53 β et Δ 133p53 γ . Ceux-ci peuvent également être traduits en six protéines : Δ 133p53 α , Δ 133p53 β , Δ 133p53 γ , Δ 160p53 α , Δ 160p53 β et Δ 160p53 γ . P53 α est un gène suppresseur de tumeur dont le rôle a été grandement caractérisé, mais des études récentes suggèrent que l'isoforme Δ 133p53 agirait à titre d'oncogène dominant.¹⁵⁷

Nous avons donc étudié les mécanismes de régulation transcriptionnelle médiée par ETV6 sur les promoteurs classique et alternatif de *TP53*. Ceci a mené à l'identification de deux nouvelles cibles transcriptionnelles d'ETV6, p53 et Δ 133p53, dont la régulation de l'expression au niveau transcriptionnel dépend du promoteur et du contexte cellulaire. Nous avons également noté que l'isoforme

$\Delta 133p53\alpha$ est davantage présent chez les patients atteints de la LLA pré-B pédiatrique, comparativement à des individus contrôles. Cette étude suggère donc une implication du gène *TP53* et de son isoforme $\Delta 133p53$ dans la LLA pré-B pédiatrique, un cancer sporadique où seulement 5% des patients présentent une mutation inactivatrice dans le gène *TP53*.^{35,158}

Pour cet article, Camille Malouf a réalisé les expériences de PCR, de sous-clonage moléculaire et de mutagenèse dirigée. Elle a également optimisé les expériences d'essais luciférases qui permettent de reconnaître les cibles transcriptionnelles d'ETV6 de façon spécifique. Ces essais luciférases permettent également d'identifier les mécanismes moléculaires utilisés par ETV6 pour réprimer la transcription. Lors de la rédaction du papier, elle a créé les figures et tableaux et elle a rédigé le texte. Sylvie Langlois a réalisé les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine. Josiane Larose a contribué à la réflexion scientifique. Benjamin Neveu a participé à certaines des expériences présentées dans le manuscrit, réalisées dans le cadre de son stage de recherche en biochimie. Ekaterini A. Kritikou a révisé le manuscrit. Daniel Sinnett est l'investigateur principal du projet. Le manuscrit sera soumis au journal EMBO J au mois de février 2012.

P53 isoforms are regulated by ETV6, a transcriptional repressor deregulated in childhood leukemia.

Camille Malouf¹⁻², Josiane Larose¹, Sylvie Langlois¹, Benjamin Neveu¹⁻² Ekaterini A. Kritikou¹ and Daniel Sinnett¹⁻³

¹ Division of Hemato-Oncology, Research Center Sainte-Justine University Health Center, Montreal, Canada H3T 1C5 ; ² Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Montreal, H3T 1J4; ³ Department of Paediatrics, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Canada, H3T 1C5

Corresponding address:

Daniel Sinnett

Research Center Sainte-Justine University Health Center

3175 chemin de la Côte Ste-Catherine

Montreal (Quebec) Canada, H3T 1C5.

Phone: +1 514 345-4931 ext. 2990.

Fax : +1 514 345-4731.

Running title: p53 isoforms are regulated by ETV6.

Keywords: Childhood leukemia / ETV6 / p53 isoforms / promoter activity / transcriptional regulation.

2.2. Abstract.

Pre-B acute lymphoblastic leukemia (pre-B ALL) is the most frequent paediatric cancer. In 25% of childhood pre-B ALL, the t(12;21) ETV6-AML1 is often accompanied by a deletion of the non-translocated ETV6 allele, indicating that the ETV6 transcription factor functions as a tumour suppressor. We have postulated that loss of ETV6 impacts leukemogenesis through dysregulation of its transcriptional targets. Here, we investigated the expression pattern of the p53 isoforms in a pre-B ALL cohort in which the majority of patients expressed the $\Delta 133p53\alpha$ mRNA, compared to control individuals. By combining gene reporter assays and chromatin immunoprecipitation experiments, we show that ETV6 represses the transcription of the TP53 classic and alternative promoters. This regulation requires both functional domains of ETV6: the pointed (PNT) and the DNA-binding (ETS) domains. Furthermore, we show that ETV6 interferes negatively with the basal transcription of the p53 isoforms by binding an Ets binding site on chromatin. Our findings highlight the impact of ETV6 in the transcriptional regulation of both the p53 and $\Delta 133p53$ isoforms, which could be involved in the leukemogenesis process.

2.3. Introduction.

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent paediatric cancer, accounting for ~25% of all paediatric tumours (Linabery & Ross, 2008). The majority of these patients will develop leukemia precursor B lymphocytes (pre-B ALL, ~85%), whereas the rest of cases will develop leukemia precursor T lymphocytes (pre-T ALL, ~15%). Childhood pre-B ALL has been associated with many genetic alterations, including chromosome number anomalies and chromosomal translocations (Pui et al, 2011). The t(12p13;q21-22) *ETV6-AML1* chromosomal translocation is the most common genetic aberration in childhood pre-B ALL, occurring in 25% of pre-B ALL cases (O'Neil & Look, 2007; Rabbitts, 1991). The resulting *ETV6-AML1* chimera is caused by an in-frame fusion of an *ETV6* (erythroblast transformation-specific variant 6; also known as *TEL*) allele with an allele of *AML1* (acute myeloid leukemia 1) (Ford et al, 1998). Although this translocation constitutes a first step in leukemogenesis, additional steps are required for leukemia initiation (van der Weyden et al, 2011). Particularly, the complete inactivation of *ETV6*, through a permanent loss of expression in the leukemia pre-B lymphocytes, is required for leukemogenesis to occur (Anderson et al, 2011; Montpetit et al, 2002; Patel et al, 2003). The non-translocated *ETV6* allele is inactivated through complete or partial deletion in 70-90% of pre-B ALL cases carrying the t(12;21) translocation (Lilljebjorn et al, 2010; Montpetit et al, 2002; Montpetit et al, 2004). Most importantly, the loss of *ETV6* expression in patients is confined to the leukemia cells, whereas the normal lymphocytes retain *ETV6* expression (Poirel et al, 1998). *In vivo* studies in transgenic mice (Morrow et al, 2004; Tsuzuki et al, 2004), zebrafish (Sabaawy et al, 2006) and humanized

NOD/SCIDy mice transplanted with cord blood (Hong et al, 2008) have clearly shown that the ETV6-AML1 chimera alone does not promote the development of pre-B ALL.

ETV6 is a ubiquitously expressed transcription factor of the Ets family (Lopez et al, 1999), which has two functional domains: the Pointed domain (PNT) responsible for oligomerization and protein interactions and the DNA-binding domain (ETS). Unlike most Ets transcription factors that function as transcriptional activators, ETV6 has been shown to function as a transcriptional repressor (Lopez et al, 1999). ETV6 has an essential role in fetal hematopoiesis (Wang et al, 1998) and can inhibit the apoptosis of adult hematopoietic stem cells in the bone marrow (Hock et al, 2004). Numerous studies have investigated the function of the ETV6-AML1 chimera to understand its role in leukemogenesis. It has been shown that ETV6-AML1 chimera might function as a transcriptional repressor through the recruitment of co-repressors and histone deacetylases (HDACs) by the ETV6 moiety (Morrow et al, 2007; Starkova et al, 2007). It has also been recently suggested that the ETV6-AML1 chimera can regulate the transcription of the miRNA clusters 494, 320 and 125-b-2, which are implicated in apoptosis and cellular proliferation (Diakos et al, 2010; Gefen et al, 2010).

We reasoned that ETV6 is mediating its functions in normal development and leukemogenesis through regulation of its transcriptional target genes. Very few transcriptional targets of ETV6 have been identified: macrophage colony-stimulating factor receptor (*MCSFR*) (Fears et al, 1997), platelet glycoprotein-Iba (*Gplba*) and -IX (*GpIX*) (Kwiatkowski et al, 1998), matrix metalloprotein-3 (*MMP-3*) (Fenrick et al, 2000) and the anti-apoptotic protein *BCL-X_L* (Irvin et al, 2003). By

combining microarray experiments and qPCR analysis in pre-B ALL patients, we have previously shown that *TP53* is a putative transcriptional target of ETV6 (Boily et al, 2007). *TP53* is a well-characterized tumour suppressor gene, which is inactivated in more than 50% of solid tumours; however, inactivating mutations of *TP53* are found in only 5% of childhood pre-B ALL (Cheung et al, 2009). The *TP53* gene has a complex transcriptional expression pattern and encodes different p53 mRNA and protein variants (Bourdon et al, 2005; Marcel et al, 2010), through the existence of an internal promoter, the use of alternative splicing sites and the availability of different translation initiation sites (Figure 6A). The classic *TP53* promoter leads to the transcription of the p53 transcripts, which can be alternatively spliced – p53 α , p53 β , p53 γ – and possess two translation initiation sites – ATG1 and ATG40 (Bourdon et al, 2005; Marcel et al, 2010). The alternative *TP53* promoter produces the Δ 133p53 transcripts, which can also be alternatively spliced – Δ 133p53 α , Δ 133p53 β , Δ 133p53 γ – and have two translation initiation sites – ATG133 and ATG160 (Bourdon et al, 2005; Marcel et al, 2010). Therefore, the human *TP53* gene can be expressed as twelve proteins (Figure 6B). Although the p53 protein is ubiquitously expressed, the Δ 133p53 protein has a tissue-specific expression pattern which is deregulated in some solid tumours (Bourdon et al, 2005). A recent study, using a mouse expressing an N-terminal deletion mutant of p53 (Δ 122p53) that corresponds to human Δ 133p53, indicated that the Δ 122p53 protein is a dominant oncogene. The authors proposed that the human Δ 133p53 functions to promote cell proliferation and inflammation, and thereby promote tumour development (Slatter et al, 2011).

Using a nested PCR approach, we investigated the expression of the p53 and $\Delta 133p53$ mRNAs as well as their respective splicing variants (α , β , γ) in a cohort of pre-B ALL patients and normal individuals. To assess whether p53 and $\Delta 133p53$ are transcriptional targets of ETV6, we performed gene reporter assays, site-directed mutagenesis and chromatin immunoprecipitation experiments in different cell types. We found that ETV6 regulates the activity of both the *TP53* classic and alternative promoters. The ETV6-mediated transcription of the *TP53* classic promoter involves both functional domains of ETV6 (PNT and ETS) and, depending on the cellular context, a consensus Ets binding site (EBS), indicating that p53 is a direct transcriptional target of ETV6. The *TP53* alternative promoter was also repressed by ETV6, with both functional domains (PNT and ETS) of ETV6 required for this repression. However, even though ETV6 occupies the *TP53* alternative promoter, transcriptional regulation of the *TP53* alternative promoter does not require the recognition of a consensus EBS by ETV6. These findings indicate that $\Delta 133p53$ is regulated by ETV6, but through a yet unknown molecular mechanism. Ultimately, this study identifies new transcriptional targets of ETV6, p53 and $\Delta 133p53$, and presents evidence that the molecular mechanisms involved in the ETV6-mediated transcriptional repression are cell-specific. We propose that the inactivation of ETV6 can lead to a deregulated expression of the p53 and $\Delta 133p53$ isoforms, which could be favourable to the development of childhood pre-B ALL.

2.4. Results.

p53 isoforms in childhood pre-B ALL.

Taking advantage of an ETV6 inducible-system and gene expression analysis by microarray technology, we have previously shown that *TP53* is a putative transcriptional target of ETV6 (Boily et al, 2007). Based on this finding, we investigated the expression of the p53 mRNA (α - β - γ) transcribed from the *TP53* classic promoter, as well as the expression of the Δ 133p53 mRNA (α - β - γ) transcribed from the *TP53* alternative promoter in the presence and absence of the t(12;21) *ETV6-AML1* translocation in childhood pre-B ALL samples. We reasoned that reduced expression of ETV6 in pre-B ALL patients might lead to deregulated expression of the p53 isoforms. We analysed the expression of the six p53 mRNA isoforms, using a semi-quantitative nested PCR approach. This approach requires a small amount of the tumoral material compared to protein/RNA studies using acrylamide/formaldehyde electrophoresis. Furthermore, the combination of two PCR reactions ensures the specificity of the p53 isoforms detection by gel electrophoresis.

We used the tumoral material extracted from the bone marrow material from 26 patients the Quebec Childhood ALL (QcALL) study: 13 patients with the t(12;21) translocation and 13 patients with no reported chromosomal translocation (patients 1 to 13 and patients 14 to 26, respectively; Figure 6C). Direct sequencing of the coding sequence of *TP53* confirmed the absence of putative inactivating mutations in *TP53* (data not shown). The patients' information (gender, age, risk at diagnosis, etc.) is listed in the Table III. We also used control material extracted from the bone

marrow of seven normal individuals (individuals A to G, Figure 6C). Both the p53 α and p53 β mRNA were expressed in all control individuals (n = 7), whereas the p53 γ mRNA was less represented than the other p53 mRNAs (n = 3) (Figure 6C). GAPDH was used as an internal control. Its presence in the negative control lane is due to the presence of genomic DNA (Figure 6C).

The p53 α and p53 β mRNA were expressed in all samples from leukemia patients (n = 26). Even though the nested PCR is semi-quantitative, we can see by visual inspection that the expression of the p53 α mRNA is more variable between pre-B ALL patients compared to control individuals (Figure 6C). The expression of p53 γ mRNA was detected in most pre-B ALL patients (n = 19), but we observe by visual inspection that the levels of p53 γ is weaker compared to p53 α and p53 β mRNA in both pre-B ALL patients and control individuals (Figure 6C). We were unable to observe any significant differences between the patients carrying the t(12;21) translocation and the ones with no reported translocation. A Fisher's exact test was used to compare the expression status of p53 γ mRNA between pre-B ALL patients and control individuals, and showed to significant differences between the two groups (Table IV, bilateral p-value = 0.1863). Therefore, the expression of the p53 isoforms does not seem to be deregulated in childhood pre-B ALL.

The $\Delta 133p53\alpha$ isoforms is more present in childhood pre-B ALL.

The recently discovered $\Delta 133p53$ mRNA isoforms are transcribed from the *TP53* alternative promoter and are subjected to a similar splicing pattern than the p53 mRNA (Bourdon et al, 2005). In normal individuals, we could detect the expression

of only the $\Delta 133p53\alpha$ ($n = 3$) or $\Delta 133p53\beta$ mRNA ($n = 3$) (Figure 6C). The $\Delta 133p53\beta$ molecular weight of normal individual B was higher than expected (~1600 bp), suggesting an aberrant splicing pattern of this isoform. We could not detect the expression of the $\Delta 133p53\gamma$ mRNA (Figure 6C). Pre-B ALL patients expressed the $\Delta 133p53\alpha$ mRNA ($n = 24$), the $\Delta 133p53\beta$ mRNA ($n = 18$) and the $\Delta 133p53\gamma$ mRNA ($n = 3$) (Figure 6C). We noted slight differences in the molecular weight of $\Delta 133p53\alpha$ and $\Delta 133p53\beta$ between some patients, suggesting that the splicing pattern of the $\Delta 133p53$ isoforms is complex and easily deregulated in childhood pre-B ALL. As discussed above and similar to the p53 isoforms, we did not observe any obvious differences between samples with no reported translocation and samples with the t(12;21) translocation. Noteworthy, Fisher's exact test detected a significant differences between the expression status of the $\Delta 133p53\alpha$ mRNA in pre-B ALL patients compared to normal individuals (Table IV, bilateral p-value = 0.0108). We did not observe a difference for the $\Delta 133p53\beta$ mRNA (Table IV, bilateral p-value = 0.3774). Therefore, our results suggest that the $\Delta 133p53\alpha$ is expressed more frequently in childhood pre-B ALL patients than in normal individuals.

Given the limited number of samples and the fact that the nested PCR is not a quantitative approach, it is difficult to ascertain whether the expression pattern of the p53 and $\Delta 133p53$ mRNAs associates with factors like gender, age, risk at diagnosis, etc. We used a Kruskal-Wallis One Way ANOVA with a Dunn's multiple comparison test and found no significant differences between the expression status of p53 γ mRNA, $\Delta 133p53\alpha$ mRNA and $\Delta 133p53\beta$ mRNA according to the following clinical features: blast distribution in the bone marrow, age at diagnosis,

white blood cell count and platelet count in the peripheral circulation (Table V). Further analysis with other patient cohorts will be useful to investigate an association of the TP53 expression with leukemogenesis as well as treatment response and disease outcome, as has been previously reported for breast cancer (Bourdon et al, 2011).

ETV6 binds to chromatin of the *TP53* classic (P1) and alternative (P2) promoters.

We have previously shown that TP53 expression is modulated by ETV6 in pre-B ALL patients (Boily et al, 2007). Therefore, we decided to investigate whether the p53 isoforms are direct transcriptional targets of ETV6 by performing chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments in HeLa cells. We selected two chromatin regions for both the *TP53* classic and alternative promoters, located in the proximal and basal promoter regions (Figure 7A). As a negative control, we used a region located in the chromosome-associated protein D2 (*NCAPD2*) gene on chromosome 12 (Figure 7B, negative control). The positive controls, named "14834", maps to the proximal promoter of the activator of basal transcription 1 (*ABT1*) gene (Figure 7B). In HeLa cells, ETV6 occupies the *TP53* classic promoter (P1): -753 to -599 located in the proximal region and -97 to +80 in the basal promoter region. ETV6 also occupies the *TP53* alternative promoters (P2): -308 to -102 and +25 and +227, both located in the basal promoter region (Figure 7B).

ETV6 regulates the *TP53* classic (P1) and alternative (P2) promoters.

Given that inactivating mutations of *TP53* are found in only 5% of childhood ALL cases and we found that ETV6 is enriched in the *TP53* classic and alternative promoters, we investigated whether ETV6 could regulate the activity of the *TP53* classic (P1) and alternative (P2) promoters.

We used *in vitro* gene reporter assays in HeLa cells (Figure 8C). Since ETV6 is expressed ubiquitously, we chose to test the ETV6-mediated transcriptional regulation in another cell line: Jurkat cells (Figure 8D). These experiments were optimized with an artificial promoter name 3EBS-tk, which consists of three tandem consensus EBS upstream of the thymidine kinase proximal promoter. We confirmed previous observations showing that ETV6 overexpression represses the activity of the 3EBS-tk (Bosselut et al, 1993; Poirel et al, 1997). We also used the proximal promoter of the transcription factor Dp-1 (*TFDP1*) gene, since its expression does not vary according to ETV6 expression status in a cohort of childhood pre-B ALL (Figure 8A) (Ross et al, 2003). ETV6 overexpression expression did not affect the promoter activity of *TFDP1* in HeLa cells (Figure 8B). The *TFDP1* promoter region harbored a region of 2000 bp upstream the transcription start site. Even though there was a small decrease in the *TFDP1* promoter activity following ETV6 overexpression in Jurkat cells, the ETV6-mediated transcriptional repression of the 3EBS-tk promoter was stronger (Figure 8B).

For the *TP53* classic (P1) and alternative (P2) promoters, we subcloned a region of 2.3 kb and 1.6 kb of the proximal promoters, respectively (Figure 7A). The Transfac tool predicted many consensus EBS in both *TP53* promoters (Figure

7A), which indicated that they can be regulated by Ets transcription factors (Matys et al, 2006). Gene reporter assays in HeLa and Jurkat cells (Figure 8C-D) show that the activity of the full-length proximal promoters (P1 -2223 to +80 and P2 -1295 to +290) were repressed in response to the expression of the full-length ETV6. The -2223 to -250 region of the TP53 classic promoter and the -1295 to +14 of the TP53 alternative promoter contain regulatory elements that could contribute to the transcriptional repression. In all experiments, the *TP53* classic promoter showed greater activity than the alternative promoter (Figure 8C-D), indicating that the *TP53* classic and alternative promoters have distinct mechanisms of transcriptional regulation

We then performed promoter deletions to identify the minimal promoter region essential to the ETV6-mediated transcriptional repression of the *TP53* promoters (Figure 8C-D). Each promoter was generated by PCR amplification, followed by subcloning into the pGL3b vector. We identified a region close to the basal *TP53* classic and alternative promoters that are necessary for the ETV6-mediated transcriptional repression (P1 -250 to +80 and P2 +14 to 290). Both regions possess the regulatory elements involved in the initiation of transcription and consensus EBS potentially recognized by ETV6

The functional domains of ETV6, PNT and ETS, are essential to the transcriptional repression.

ETV6 has two functional domains: PNT (oligomerization and protein interactions) and ETS (DNA-binding function). To investigate the biological impact of each domain on the transcriptional regulation of the *TP53* promoters, we created distinct

constructs that lack each domain (Figure 9A). Using immunohistochemistry in HeLa cells, we observed that ETV6 Δ PNT localizes mainly to the nucleus whereas ETV6 Δ ETS is present in both the nucleus and cytoplasm (data not shown). We tested the *TP53* proximal promoters (P1 -2223 to +80 and P2 -1295 to +290), as well as their basal promoters (P1 -250 to +80 and P2 +14 to +290), by gene reporter assays (Figure 9B-C, 10 and 11). We show that lack of the PNT domain (pcDNA3.1-ETV6 Δ PNT) abolished the ETV6-mediated transcriptional repression on the *TP53* proximal promoter activity in both cell lines tested. We found that the ETS domain is also required for the repression of p53 isoforms (pcDNA3.1-ETV6 Δ ETS) as its absence abolished the transcriptional repression by ETV6. We conclude that the PNT and ETS domains are both implicated in the ETV6-mediated transcriptional regulation of the p53 isoforms.

ETV6 regulates p53 transcription through a consensus EBS depending on the promoter and the cellular context.

The Ets transcription factors have been shown to recognize a consensus Ets-binding site (EBS), which consists of a core GGAA/T sequence with adjacent rich purine sequences (Oikawa, 2004). To investigate whether the ETS domain is implicated in the DNA-binding function of ETV6, we mutated the core of the putative consensus EBS located in *TP53* promoters (Table VI) (Starck et al, 1999). We only tested the consensus EBS present in the basal promoter regions of *TP53* that were responsive to an overexpression of ETV6 (P1 -250 to +80 and P2 +14 to +290). We tested both the *TP53* classic and alternative promoters that, according to our ChIP experiments, are both occupied by ETV6 (Figure 7B).

The *TP53* classic promoter (P1) has three predicted EBS (EBS -90/-80/-77) whereas the *TP53* alternative promoter (P2) has four predicted EBS (named EBS +155/+195/+246/+252). For the *TP53* classic promoter, the individual mutation of the EBS -90/-80/-77 cores was sufficient to eliminate the ETV6-mediated transcriptional repression in HeLa cells (Figure 10A). As expected, the truncated versions of ETV6 (pcDNA3.1-ETV6 Δ PNT and pcDNA3.1-ETV6 Δ ETS) did not regulate the activity of the *TP53* classic promoter with individually mutated EBS -90/-80/-77. This was also confirmed using a Two-Way ANOVA with a Bonferroni post test to compare the residual promoters' activities (wild-type and mEBS) after ETV6 overexpression (Table VI). By contrast, the individual mutations of predicted EBS in the *TP53* classic promoter still responded to the ETV6-mediated transcriptional repression in Jurkat cells (Figure 10B). The activity of the mutated *TP53* classic promoters was 15-75 fold-higher than the empty pGL3basic vector (Figure 10). Therefore, all the *TP53* classic promoters tested are active. The mutated *TP53* classic promoters' activities were lower than the native *TP53* classic promoter, suggesting that EBS -90/-80/-77 can also be recognized by transcriptional activators. In fact, most Ets transcription factors act as transcriptional activators.

The individual mutations of the consensus EBS of the *TP53* alternative promoter (EBS +155/+195/+246/+252) did not affect the transcriptional repression driven by ETV6 neither in HeLa, nor in Jurkat cells (Figure 11A-B). This was also confirmed by comparing the residual promoters' activities after ETV6 overexpression (Table VI). Interestingly, EBS +252 seems to act as positive regulatory element of the *TP53* alternative promoter, but we have yet to identify the

transcriptional factors responsible for this transcriptional response (Figure 11). Our results suggest that ETV6 regulates transcription of the *TP53* promoters through distinct molecular mechanisms that depend on the target promoter, as well as the cellular context.

2.5. Discussion.

TP53 is a tumour suppressor gene that is highly mutated in solid tumours; however, inactivating mutations have only been found in 5% of childhood leukemias. How *TP53* might affect leukemia initiation, progression and disease risk/outcome remain unclear. We have previously shown that *TP53* is a putative transcriptional target of *ETV6*, a transcriptional repressor frequently inactivated in childhood ALL (Boily et al, 2007). In this study, we report the deregulated expression of the $\Delta 133p53\alpha$ isoforms in childhood pre-B ALL and show that *ETV6* regulates both the classic and alternative *TP53* promoters through different mechanisms.

The $\Delta 133p53\alpha$ are more represented in childhood pre-B ALL compared to control individuals.

We investigated the expression of p53 and $\Delta 133p53$ mRNA isoforms in pre-B ALL patients: p53 α , p53 β and p53 γ (translated in p53 and $\Delta 40p53$ proteins) - $\Delta 133p53\alpha$, $\Delta 133p53\beta$ and $\Delta 133p53\gamma$ (translated in $\Delta 133p53$ and $\Delta 160p53$ proteins). These six p53 mRNAs are responsible for the expression of twelve p53 proteins (Figure 6B). We found that bone marrow samples from pre-B ALL patients, who harbored no inactivating mutation in the *TP53* coding sequence, maintained the expression of the p53 isoforms transcribed from the classic *TP53* promoter. We observed expression of p53 α and p53 β mRNA in all the pre-B ALL samples studied, as well as in the control individuals. The expression of p53 γ mRNA was more variable in both pre-B ALL patients and control individuals.

The expression of p53 mRNA was not associated with the translocation status (t(12;21) ETV6-AML1) or the expression of ETV6 (LOH on chromosome 12). Because p53 α can activate the transcription of the Δ 133p53 transcript, the expression of p53 could favour the transcription of the Δ 133p53 mRNA in pre-B ALL (Aoubala et al, 2011). In fact, one or more Δ 133p53 mRNA isoforms, which are also present in some solid tumours like breast (Bourdon et al, 2005) and colon carcinoma (Fujita et al, 2009), were expressed in almost all the pre-B ALL samples tested from our cohort. Using a Fisher's exact test, we also noted that the Δ 133p53 α isoform is more present in pre-B ALL patients than in normal individuals. Expression of a Δ 122p53 in mice, a Δ 133p53-like isoform, can induce hyperproliferation and an inflammation phenotype as well as favour the formation of multiple lymphocyte aggregates and extramedullary haematopoiesis (Slatter et al, 2011). The prevalence of tumours in Δ 122p53^{+/+} mice was as high as the p53^{-/-} mice; however, the different spectrum of tumours indicated that the p53 and Δ 133p53 pathways have distinct biological roles (Slatter et al, 2011). In fact, the diffuse large B-cell lymphoma, an aggressive haematological malignancy, was the most prevalent tumours in Δ 122p53^{+/+} mice (Slatter et al, 2011). Association studies between isoform expression patterns and risk/disease outcome of the different ALL subtypes in large cohorts will be valuable to determine a possible role of the Δ 133p53 proteins in childhood leukemogenesis.

The TP53 classic promoter is a direct transcriptional target of ETV6.

We observed a significant enrichment of ETV6 on chromatin regions located in both proximal and basal regions of the *TP53* classic promoter (Figure 7B) as well

as a significant decrease of the *TP53* classic promoter's activity following ETV6 overexpression (Figure 8C-D), clearly showing that p53 is a direct transcriptional target of ETV6. ETV6 can bind multiple chromatin regions on the *TP53* classic promoter, a function accomplished by its DNA-binding ETS domain (Figure 9B-C). We identified three predicted consensus EBS situated approximately 100 bp upstream the transcription start site that are recognized by ETV6 (Figure 10). These DNA motifs were essential to the ETV6-mediated repression in cervical cells, but not in leukemic T lymphocytes. The ability of ETV6 to recognize a particular consensus EBS during transcriptional repression may depend on the spectrum of expressed transcription factors in the cell. As the Ets family has more than 27 members that may potentially recognize the same consensus EBS, ETV6 may use many molecular mechanisms (simultaneously or independently) to regulate transcription. In fact, the lack of the PNT domain compromised the ability of ETV6 to regulate transcription (Figure 9B-C), suggesting that ETV6 needs to recruit other transcription factors and co-factors to regulate p53 transcription. The PNT domain is required for ETV6 homodimerization and oligomerization with other Ets factors like ETV7 and FLI-1 (Kwiatkowski et al, 2000; Potter et al, 2000). Other proteins that have been shown to interact with ETV6 and to be involved in transcriptional repression include interferon regulatory factor 8 transcription factor (IRF8) (Kuwata et al, 2002), histone deacetylase 3 (HDAC3) (Kuwata et al, 2002), the mSin3A/NCOR/SMRT chromatin modifying corepressor complex (Chakrabarti & Nucifora, 1999), etc. Whether any of these factors is required for transcription of the p53 isoforms and whether different mechanisms depend on cellular context remains unclear.

The TP53 alternative promoter (P2) is also a direct transcriptional target of ETV6.

The *TP53* alternative promoter's transcriptional activity was also regulated by ETV6 (Figure 8C-D), but differently from the *TP53* classic promoter. The overexpression of ETV6 does decrease the *TP53* alternative promoter's activity, and the removal of the PNT and ETS domains abolish the ETV6-mediated transcription repression (Figure 9B-C). Since ETV6 does not recognize the predicted consensus EBS of the *TP53* alternative promoter (Figure 11), we postulate that ETV6 could regulate the activity of the *TP53* promoter through indirect binding. Importantly, the ETS domain is implicated in the nuclear localization of ETV6 (Park et al, 2006), which could explain its requirement in a situation in which the consensus EBS are not essential to the transcriptional regulation. As discussed above, ETV6 can regulate transcription through the recruitment of transcription factors and other proteins required for transcriptional initiation as well as through different mechanisms. For example, ETV6 overexpression has been shown to repress the transcriptional activity of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) transcription factor in melanoma cells (Schick et al, 2004). Intriguingly, Stat3 repression did not require ETV6 DNA binding and appeared to proceed via recruitment of ETV6 to STAT3 pointing to a novel mechanism regulating the STAT3 signalling pathway. Whether a similar mechanism regulates the activity of the *TP53* alternative promoter requires further investigation.

ETV6, which is frequently inactivated in childhood pre-B ALL, could be part of the puzzle that can explain the deregulated expression of the p53 isoforms in

pre-B ALL (see Figure 12A). ETV6 can regulate transcription of the p53 isoforms through different mechanisms. Our data suggests that in cervical cells, ETV6 directly binds to a consensus EBS to regulate transcription (Figure 12B, model 1). However, the most likely scenario for the ETV6-mediated transcriptional repression of the *TP53* classic promoter in T lymphocytes involves binding of chromatin through another transcription factor (Figure 12B, model 2). Since the consensus EBS of the *TP53* alternative promoter are not recognized by ETV6 on both cervical cells and leukemic T lymphocytes, it is most likely that ETV6 also acts as a co-factor to repress transcription of the *TP53* alternative promoter (Figure 12B, model 2). When ETV6 is inactivated, the DNA motifs recognized by ETV6 (EBS or other) then become available for other transcription factors (Figure 12B, model 3). Furthermore, the transcription factors that were bound by ETV6 could become available to regulate positively the *TP53* alternative promoter (Figure 12B, model 4). For example, p53 α has been shown to modulate transcription of p53 and Δ 133p53 isoforms (Aoubala et al, 2011). Therefore, in the absence of the ETV6 transcriptional repressor, p53 α could result in increased transcription of these isoforms. Given the putative role of Δ 133p53 as an oncogene (Slatter et al, 2011), its expression could favour the initiation and maintenance of childhood leukemogenesis.

In conclusion, we propose that the inactivation of ETV6 may lead to dysregulation of the molecular mechanisms governing the transcription of the p53 isoforms through multiple mechanisms. The dysregulated expression of Δ 133p53 α isoforms in pre-B ALL patients points to a possible role of this recently identified oncogene in leukemogenesis. In agreement with this notion, it has recently been

proposed that the presence of $\Delta 133p53$ would favour a p53-dependent pro-survival response (Khoury & Bourdon, 2011). Whether all or some of the p53 isoforms are implicated in the leukemogenesis process and their role in treatment responses and disease outcome require further investigation.

2.6. Material and methods

Nested RT-PCR

We measured the expression of p53 isoforms mRNA in the mononuclear cells isolated from the bone marrow of 26 pre-B ALL patients including 13 cases with the t(12;21) translocation and 13 cases with no reported translocation, as well as in 7 control individuals. The research was approved by the Bioethic Committee of the CHU Sainte-Justine. The white blood cells were isolated using the Red Blood Cell Lysis Buffer (eBioscience), total RNA was isolated (QIAGEN RNeasy kit) and reverse transcription was performed with 125 ng of total RNA using the SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) or none for the negative/neg control, according to the manufacturer's instructions. The first PCR was done using amplimers (sequences available upon request) corresponding to the p53 and $\Delta 133p53$ mRNAs in the following mix: PCR buffer minus Mg 1X, $MgCl_2$ 1.5 mM, 0.2 mM each dNTP, 0.2 μM primer forward and reverse and 1 unit of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). The amplification program was as follows : 1x (94°C for 5 minutes), 35x (94°C for 1 minute, 58°C for 1 minute and 72°C for 1 minute), 1x (72°C for 7 minutes) and final soak at 4°C. The second PCR was done to amplify the splicing variants (α , β , γ), using the same protocol with different numbers of amplification cycles: p53 $\alpha/\beta/\gamma$ (35x), $\Delta 133p53\alpha/\beta$ (30x) and $\Delta 133p53\gamma$ (40x). GAPDH was used as a reference. PCR products were visualised by standard gel electrophoresis.

Microarray analysis

TFDP1 promoter construct was already available in our laboratory (unpublished results). To verify the expression of TFDP1, we used the microarray datasets from the St. Jude Children's Research Hospital pre-B ALL cohorts (www.stjude-research.org/data/ALL3). 3 cytogenetic groups were selected because they showed ETV6 expression in some cases: BCR-ABL, MLL and ETV6-AML1 (31 patients). This study was performed with the Affymetrix HG-U133A oligonucleotide array. Gene expression values (TFDP1 probe: 204147_s_at and ETV6: probe 205585_at) for each individual were normalized using the program GeneLinker™ Gold 3.1 (Improved Outcome Software).

Cell culture

HeLa cells (immortalized cervical cells from an adenocarcinoma patient, ATCC #CCL-2™) were maintained in DMEM cell culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent). Jurkat cells (immortalized leukemic T lymphocytes from a 14 years old patient, kindly provided by Dr. José Menezes) were maintained in RPMI-1640 cell culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent).

Molecular cloning

Both the *TP53* classic and alternative promoters were amplified by PCR and subcloned upstream of the Firefly luciferase gene in the pGL3-basic vector (Promega) using either endonuclease restriction sites or the Gateway technology (Invitrogen). The sequences of the primers used are available upon request. Each

construct was isolated through a bacterial transformation in a competent *Escherichia coli* DH5 α strain (Invitrogen) and the DNA integrity was validated by sequencing both strands. ETV6 cDNA and its truncated forms were subcloned in the pcDNA3.1 vector (Invitrogen) and their functional domains were removed by site-restricted endonuclease digestion. These sites (PacI for Δ PNT, KpnI for Δ ETS) were incorporated through site-directed mutagenesis.

Site-directed mutagenesis

The consensus EBS located in the *TP53* classic and alternative promoters were mutated EBS (core GGAA to CCAA) using the QuickChange Multi-Site/XL Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's instructions. The constructs created through directed mutagenesis were transformed in *Escherichia coli* XL10-Gold ultracompetent cells (Agilent Technologies). Mutations and the DNA integrity were validated by sequencing both strands.

Transient transfection

Cells (5×10^4 HeLa cells, 1×10^5 Jurkat cells) were transfected in a white 96-well plate using lipofectamineTM 2000 (Invitrogen) and a combination of constructs: pGL3-basic vector with promoter (99.5 ng HeLa cells, 60 ng Jurkat cells) (Promega), pcDNA3.1 vector with ETV6 cDNA (40 ng in both HeLa and Jurkat cells) (Invitrogen) and pRL-CMV vector (0.5 ng HeLa cells, 40 ng Jurkat cells) (Promega) to normalize transfection efficiency. Total DNA transfected was 200 ng for HeLa cells and 240 ng for Jurkat cells. Leucoagglutinin (PHA-L; final

concentration 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and phorbol myristyl acetate (PMA; final concentration 50 ng/mL) were added to each reaction 4 hours after transfection in Jurkat cells.

Luciferase-reporter activity assay

48 hours following transfection, Jurkat and HeLa cells were harvested with Passive Lysis Buffer 1X (Promega). Luciferase activity was measured with the LARII and Stop & Glo reagents (Promega) according to the manufacturer's instructions and the luminescence signal was measured with the LLMAX³⁸⁴ luminometer (Molecular Devices). The relative luciferase activity (firefly luciferase activity/renilla firefly activity) was used to measure the transcriptional repression exerted by ETV6, ETV6 Δ PNT and ETV6 Δ ETS on the promoters under investigation.

Chromatin immunoprecipitation assays (ChIP)

20 x 10⁶ HeLa cells inducible for ETV6-HA (hemagglutinin) were induced for 48 hours with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxycycline (Boily et al, 2007). Cells were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 minutes at room temperature, glycine stopped, rinsed and harvested. Cell pellets were lysed and sonicated to obtain 200-1500 bp fragments. After one round of immunoprecipitation with anti-HA antibody (HA probe F-7: Santa Cruz Biotechnology SC7392) or a preimmune serum (from our laboratory), the precipitates were reverse cross-linked and treated with proteinase K. The purified DNA was analysed by quantitative real-time PCR.

Statistical analysis

A Mann-Whitney t test, a Kruskal-Wallis One-way ANOVA with a Dunn's multiple comparison or a Two-way ANOVA with a Bonferroni post test were used to measure statistical differences between the promoters tested in the CHIP and luciferase-reporter activity assay, and to compare gene expression values in the microarray datasets. The significant p-value cut-off was 0.05 in all experiments. Graphs and statistical analysis were performed using the GraphPad 5.0 software.

2.7. Acknowledgements.

This work was supported by research funds provided by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Cancer Research Society. C.M. and B.N. are recipients of a FRSQ and a Cole Foundation studentships, respectively. D.S. holds the François-Karl Viau Chair in Pediatric Oncogenomics and is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

2.8. Author Contributions.

C.M. designed and performed experiments, analyzed the data and wrote the manuscript; S.L. and J.L. designed and performed experiments; B.N. performed experiments; E.K. edited the manuscript and contributed to the study concept and design; D.S. is the principal investigator of the project.

2.9. Conflicts of Interest.

All authors have agreed to the content of this manuscript and declare no competing financial interests.

Correspondence: Daniel Sinnett, Research Center Sainte-Justine University Health Center, 3175 chemin de la Côte-Ste-Catherine, Montreal, Canada, H3T 1C5

2.10. References.

Anderson K, Lutz C, van Delft FW, Bateman CM, Guo Y, Colman SM, Kempinski H, Moorman AV, Tittley I, Swansbury J, Kearney L, Enver T, Greaves M (2011) Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* **469**: 356-361

Aoubala M, Murray-Zmijewski F, Khoury MP, Fernandes K, Perrier S, Bernard H, Prats AC, Lane DP, Bourdon JC (2011) p53 directly transactivates Delta133p53alpha, regulating cell fate outcome in response to DNA damage. *Cell Death Differ* **18**: 248-258

Boily G, Larose J, Langlois S, Sinnett D (2007) Identification of transcripts modulated by ETV6 expression. *Br J Haematol* **136**: 48-62

Bosselut R, Levin J, Adjadj E, Ghysdael J (1993) A single amino-acid substitution in the Ets domain alters core DNA binding specificity of Ets1 to that of the related transcription factors Elf1 and E74. *Nucleic Acids Res* **21**: 5184-5191

Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, Saville MK, Lane DP (2005) p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* **19**: 2122-2137

Bourdon JC, Khoury MP, Diot A, Baker L, Fernandes K, Aoubala M, Quinlan P, Purdie CA, Jordan LB, Prats AC, Lane DP, Thompson AM (2011) p53 mutant breast cancer patients expressing p53gamma have as good a prognosis as wild-type p53 breast cancer patients. *Breast Cancer Res* **13**: R7

Chakrabarti SR, Nucifora G (1999) The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. *Biochem Biophys Res Commun* **264**: 871-877

Cheung KJ, Horsman DE, Gascoyne RD (2009) The significance of TP53 in lymphoid malignancies: mutation prevalence, regulation, prognostic impact and potential as a therapeutic target. *Br J Haematol* **146**: 257-269

Diakos C, Zhong S, Xiao Y, Zhou M, Vasconcelos GM, Krapf G, Yeh RF, Zheng S, Kang M, Wiencke JK, Pombo-de-Oliveira MS, Panzer-Grumayer R, Wiemels JL (2010) TEL-AML1 regulation of survivin and apoptosis via miRNA-494 and miRNA-320a. *Blood* **116**: 4885-4893

Fears S, Gavin M, Zhang DE, Hetherington C, Ben-David Y, Rowley JD, Nucifora G (1997) Functional characterization of ETV6 and ETV6/CBFA2 in the regulation of the MCSFR proximal promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 1949-1954

Fenrick R, Wang L, Nip J, Amann JM, Rooney RJ, Walker-Daniels J, Crawford HC, Hulboy DL, Kinch MS, Matrisian LM, Hiebert SW (2000) TEL, a putative tumor suppressor, modulates cell growth and cell morphology of ras-transformed cells while repressing the transcription of stromelysin-1. *Mol Cell Biol* **20**: 5828-5839

Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MC, Van Wering ER, Greaves M (1998) Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4584-4588

Fujita K, Mondal AM, Horikawa I, Nguyen GH, Kumamoto K, Sohn JJ, Bowman ED, Mathe EA, Schetter AJ, Pine SR, Ji H, Vojtesek B, Bourdon JC, Lane DP, Harris CC (2009) p53 isoforms Delta133p53 and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nat Cell Biol* **11**: 1135-1142

Gefen N, Binder V, Zaliova M, Linka Y, Morrow M, Novosel A, Edry L, Hertzberg L, Shomron N, Williams O, Trka J, Borkhardt A, Izraeli S (2010) Hsa-mir-125b-2 is highly expressed in childhood ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) leukemias and confers survival advantage to growth inhibitory signals independent of p53. *Leukemia* **24**: 89-96

Hock H, Meade E, Medeiros S, Schindler JW, Valk PJ, Fujiwara Y, Orkin SH (2004) Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev* **18**: 2336-2341

Hong D, Gupta R, Ancliff P, Atzberger A, Brown J, Soneji S, Green J, Colman S, Piacibello W, Buckle V, Tsuzuki S, Greaves M, Enver T (2008) Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science* **319**: 336-339

Irvin BJ, Wood LD, Wang L, Fenrick R, Sansam CG, Packham G, Kinch M, Yang E, Hiebert SW (2003) TEL, a putative tumor suppressor, induces apoptosis and represses transcription of Bcl-XL. *J Biol Chem* **278**: 46378-46386

Khoury MP, Bourdon JC (2011) p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor? *Genes Cancer* **2**: 453-465

Kuwata T, Gongora C, Kanno Y, Sakaguchi K, Tamura T, Kanno T, Basrur V, Martinez R, Appella E, Golub T, Ozato K (2002) Gamma interferon triggers interaction between ICSBP (IRF-8) and TEL, recruiting the histone deacetylase HDAC3 to the interferon-responsive element. *Mol Cell Biol* **22**: 7439-7448

Kwiatkowski BA, Bastian LS, Bauer TR, Jr., Tsai S, Zielinska-Kwiatkowska AG, Hickstein DD (1998) The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem* **273**: 17525-17530

Kwiatkowski BA, Zielinska-Kwiatkowska AG, Bauer TR, Jr., Hickstein DD (2000) The ETS family member Tel antagonizes the Fli-1 phenotype in hematopoietic cells. *Blood Cells Mol Dis* **26**: 84-90

Lilljebjorn H, Sonesson C, Andersson A, Heldrup J, Behrendtz M, Kawamata N, Ogawa S, Koeffler HP, Mitelman F, Johansson B, Fontes M, Fioretos T (2010) The correlation pattern of acquired copy number changes in 164 ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemias. *Hum Mol Genet* **19**: 3150-3158

Linabery AM, Ross JA (2008) Trends in childhood cancer incidence in the U.S. (1992-2004). *Cancer* **112**: 416-432

Lopez RG, Carron C, Oury C, Gardellin P, Bernard O, Ghysdael J (1999) TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem* **274**: 30132-30138

Marcel V, Perrier S, Aoubala M, Ageorges S, Groves MJ, Diot A, Fernandes K, Tauro S, Bourdon JC (2010) Delta160p53 is a novel N-terminal p53 isoform encoded by Delta133p53 transcript. *FEBS Lett* **584**: 4463-4468

Matys V, Kel-Margoulis OV, Fricke E, Liebich I, Land S, Barre-Dirrie A, Reuter I, Chekmenev D, Krull M, Hornischer K, Voss N, Stegmaier P, Lewicki-Potapov B, Saxel H, Kel AE, Wingender E (2006) TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **34**: D108-110

Montpetit A, Boily G, Sinnett D (2002) A detailed transcriptional map of the chromosome 12p12 tumour suppressor locus. *Eur J Hum Genet* **10**: 62-71

Montpetit A, Larose J, Boily G, Langlois S, Trudel N, Sinnett D (2004) Mutational and expression analysis of the chromosome 12p candidate tumor suppressor genes in pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **18**: 1499-1504

Morrow M, Horton S, Kioussis D, Brady HJ, Williams O (2004) TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity. *Blood* **103**: 3890-3896

Morrow M, Samanta A, Kioussis D, Brady HJ, Williams O (2007) TEL-AML1 preleukemic activity requires the DNA binding domain of AML1 and the dimerization and corepressor binding domains of TEL. *Oncogene* **26**: 4404-4414

O'Neil J, Look AT (2007) Mechanisms of transcription factor deregulation in lymphoid cell transformation. *Oncogene* **26**: 6838-6849

Oikawa T (2004) ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy. *Cancer Sci* **95**: 626-633

Park H, Seo Y, Kim JI, Kim WJ, Choe SY (2006) Identification of the nuclear localization motif in the ETV6 (TEL) protein. *Cancer Genet Cytogenet* **167**: 117-121

Patel N, Goff LK, Clark T, Ford AM, Foot N, Lillington D, Hing S, Pritchard-Jones K, Jones LK, Saha V (2003) Expression profile of wild-type ETV6 in childhood acute leukaemia. *Br J Haematol* **122**: 94-98

Poirel H, Lacronique V, Mauchauffe M, Le Coniat M, Raffoux E, Daniel MT, Erickson P, Drabkin H, MacLeod RA, Drexler HG, Ghysdael J, Berger R, Bernard OA (1998) Analysis of TEL proteins in human leukemias. *Oncogene* **16**: 2895-2903

Poirel H, Oury C, Carron C, Duprez E, Laabi Y, Tsapis A, Romana SP, Mauchauffe M, Le Coniat M, Berger R, Ghysdael J, Bernard OA (1997) The TEL gene products: nuclear phosphoproteins with DNA binding properties. *Oncogene* **14**: 349-357

Potter MD, Buijs A, Kreider B, van Rompaey L, Grosveld GC (2000) Identification and characterization of a new human ETS-family transcription factor, TEL2, that is expressed in hematopoietic tissues and can associate with TEL1/ETV6. *Blood* **95**: 3341-3348

Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ (2011) Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* **29**: 551-565

Rabbitts TH (1991) Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias. *Cell* **67**: 641-644

Ross ME, Zhou X, Song G, Shurtleff SA, Girtman K, Williams WK, Liu HC, Mahfouz R, Raimondi SC, Lenny N, Patel A, Downing JR (2003) Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood* **102**: 2951-2959

Sabaawy HE, Azuma M, Embree LJ, Tsai HJ, Starost MF, Hickstein DD (2006) TEL-AML1 transgenic zebrafish model of precursor B cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 15166-15171

Schick N, Oakeley EJ, Hynes NE, Badache A (2004) TEL/ETV6 is a signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3)-induced repressor of Stat3 activity. *J Biol Chem* **279**: 38787-38796

Slatter TL, Hung N, Campbell H, Rubio C, Mehta R, Renshaw P, Williams G, Wilson M, Engelmann A, Jeffs A, Royds JA, Baird MA, Braithwaite AW (2011) Hyperproliferation, cancer, and inflammation in mice expressing a 133p53-like isoform. *Blood*

Starck J, Doubeikovski A, Sarrazin S, Gonnet C, Rao G, Skoultchi A, Godet J, Dusanter-Fourt I, Morle F (1999) Spi-1/PU.1 is a positive regulator of the Fli-1 gene involved in inhibition of erythroid differentiation in friend erythroleukemic cell lines. *Mol Cell Biol* **19**: 121-135

Starkova J, Madzo J, Cario G, Kalina T, Ford A, Zaliova M, Hrusak O, Trka J (2007) The identification of (ETV6)/RUNX1-regulated genes in lymphopoiesis using histone deacetylase inhibitors in ETV6/RUNX1-positive lymphoid leukemic cells. *Clin Cancer Res* **13**: 1726-1735

Tsuzuki S, Seto M, Greaves M, Enver T (2004) Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 8443-8448

van der Weyden L, Giotopoulos G, Rust AG, Matheson LS, van Delft FW, Kong J, Corcoran AE, Greaves MF, Mullighan CG, Huntly BJ, Adams DJ (2011) Modeling the evolution of ETV6-RUNX1-induced B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in mice. *Blood*

Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, Davidson L, Visvader J, Kuo F, Alt FW, Gilliland DG, Golub TR, Orkin SH (1998) The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* **12**: 2392-2402

2.11. Figure Legends.

Figure 6. The expression of p53 and $\Delta 133p53$ mRNA in the bone marrow of pre-B ALL patients. (A) The p53 isoforms, with their respective promoters – classic (P1) and alternative (P2) -, their splicing sites - alpha (α), beta (β) and gamma (γ) - and their translation initiation sites - ATG1 (*) and ATG40 (**) for the p53 mRNA transcribed through the P1 promoter, ATG133 (-) and ATG160 (--) for the $\Delta 133p53$ mRNA transcribed through the P2 promoter -. Exons (boxes 1 to 11), intron 9 (i9) and splicing sites (\wedge) are indicated. (B) p53 protein isoforms, with their respective functional domains indicated on top: transactivation domain, proline-rich domain (PRD), DNA-binding domain, nuclear localization signal (NLS), oligomerization and basic region (BR). The translation initiation sites (* and **, - and --) are depicted as in Figure 1A. (C) Gel electrophoresis of the nested PCR of p53 isoforms mRNA: p53 α , p53 β , p53 γ transcribed from the *TP53* classic promoter and $\Delta 133p53\alpha$, $\Delta 133p53\beta$, $\Delta 133p53\gamma$ transcribed from the *TP53* alternative promoter (n = 2). The negative/neg control for each PCR reaction is indicated. GAPDH expression was used as a reference. Pre-B ALL patients 1 to 13 inclusively harboured the t(12;21) translocation at diagnosis. Pre-B ALL patients 14 to 26 had no described translocation at diagnosis. Individuals A to G were children that were not diagnosed with ALL and had no leukemia blasts in their bone marrow (Control). Relevant parts of the image were grouped and are separated by black lines. Adobe Photoshop 7.1 was used to adjust the image (auto-contrast and invert, only).

Figure 7. ETV6 binds the classic and alternative promoter of *TP53*. (A) The proximal promoters of *TP53* were subcloned in the pGL3-basic vector. The transcription start site (TSS) corresponds to the +1 position. The predicted consensus Ets-binding site (EBS) are depicted (▲). The promoter deletions are presented, as well as the chromatin region tested for ETV6 enrichment by chromatin immunoprecipitation. (B) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) using the ETV6-HA antibody (ETV6-HA IP, in black) and a preimmune serum as a negative control (Negative IP, in white) in HeLa cells. Datas are presented on a histogram (mean \pm SEM) where the y axis represents the % Input for the ETV6-HA (hemagglutinin) IP and the Negative IP, to minimize the contribution of the background signal (n = 2). The experimental controls, negative (-) and positive (+), are described in the results section. Statistical differences were measured with a Kruskal-Wallis One Way ANOVA followed by a Dunn's multiple comparison test. Bilateral p-values are presented: p > 0.05 (NS), p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), and p < 0.001 (***).

Figure 8. ETV6 alone can repress the activity of the *TP53* classic and alternative promoters. (A) The TFDP1 gene expression does not vary according to the expression status of ETV6 in a cohort of pre-B ALL patients (Ross et al, 2003). (B) Luciferase-reporter activity assay of the experimental controls: basic is the promoterless pGL3b vector, 3EBStk and proTFDP1 are the positive and negative control of the ETV6-mediated transcriptional repression Luciferase-reporter activity assay of both *TP53* classic and alternative promoters constructs were conducted in (C) HeLa and (D) Jurkat cells. For all the luciferase assays,

datas are presented as box-plot (whiskers: min to max) where the y axis represents the relative luciferase activity (RLA, the ratio between the promoter's activity (Firefly luciferase) and the internal control (Renilla luciferase)) (n = 4). Statistical differences for B-C-D were measured with a non parametric Mann-Whitney t test using the basal promoter activity (pcDNA3.1) as a reference. Bilateral p-values are presented: $p > 0.05$ (NS), $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***).

Figure 9. The Pointed and ETS domains are essential to the ETV6-mediated transcriptional regulation of the *TP53* promoters. (A) Truncated constructs of ETV6 cloned in the pcDNA3.1 vector: ETV6, ETV6 Δ PNT and ETV6 Δ ETS. Luciferase-reporter activity assay with the truncated ETV6 constructs (pcDNA3.1-ETV6 Δ PNT and pcDNA3.1-ETV6 Δ ETS) in (B) HeLa and in (C) Jurkat cells. Datas are presented as box-plot (whiskers: min to max) where the y axis represents the relative luciferase activity (RLA, the ratio between the promoter's activity (Firefly luciferase) and the internal control (Renilla luciferase)) (n = 4). A Kruskal-Wallis One Way ANOVA followed by a Dunn's multiple comparison test was used to compare the four experimental conditions together (pcDNA3.1, pcDNA3.1-ETV6, pcDNA3.1-ETV6 Δ PNT, pcDNA3.1-ETV6 Δ ETS). Bilateral p-values are presented: $p > 0.05$ (NS), $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***).

Figure 10. Consensus EBS are implicated in the transcription regulation of the *TP53* classic promoter. Luciferase-reporter activity assay of *TP53* classic promoter constructs bearing mutations in the core of the predicted consensus EBS

in HeLa (A) and Jurkat (B) cells. Datas are presented as box-plot (whiskers: min to max) where the y axis represents the relative luciferase activity (RLA, the ratio between the promoter's activity (Firefly luciferase) and the internal control (Renilla luciferase)) (n = 4). A Kruskal-Wallis One Way ANOVA followed by a Dunn's multiple comparison test was used to compare the four experimental conditions together (pcDNA3.1, pcDNA3.1-ETV6, pcDNA3.1-ETV6 Δ PNT, pcDNA3.1-ETV6 Δ ETS). Bilateral p-values are presented: p > 0.05 (NS), p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), and p < 0.001 (***).

Figure 11. The ETV6-mediated transcriptional repression depends on the target promoter. Luciferase-reporter activity assay of *TP53* alternative promoter constructs bearing mutations in the core of the predicted consensus EBS in HeLa (A) and Jurkat (B) cells. Datas are presented as box-plot (whiskers: min to max) where the y axis represents the relative luciferase activity (RLA, the ratio between the promoter's activity (Firefly luciferase) and the internal control (Renilla luciferase)) (n = 4). A Kruskal-Wallis One Way ANOVA followed by a Dunn's multiple comparison test was used to compare the four experimental conditions together (pcDNA3.1, pcDNA3.1-ETV6, pcDNA3.1-ETV6 Δ PNT, pcDNA3.1-ETV6 Δ ETS). Bilateral p-values are presented: p > 0.05 (NS), p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), and p < 0.001 (***).

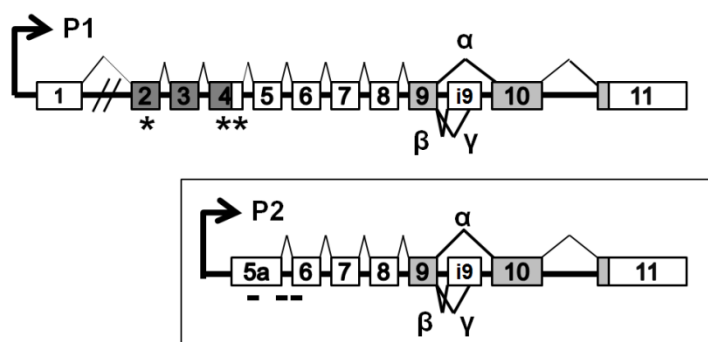
Figure 12. Proposed models for the transcriptional regulation of p53 and Δ 133p53 isoforms by ETV6. (A) In a physiological context, the cell expresses both the p53 mRNA and, sometimes, the Δ 133p53 mRNA. In childhood pre-B ALL,

there is an up-regulation of the $\Delta 133p53$ mRNA transcribed from the *TP53* alternative promoter, whereas the expression of the p53 mRNA remains similar to the physiological condition. (B) We propose four models to explain the ETV6-mediated transcriptional repression of the p53 isoforms. Under physiological conditions, ETV6 binds to chromatin on the *TP53* classic promoter, so we speculate that ETV6 can recognize a consensus Ets-binding site (EBS) on chromatin (1). In a situation where ETV6 does not recognize a consensus EBS to repress transcription, like for the *TP53* alternative promoter, we believe that the recruitment of ETV6 to the chromatin involves another transcription factor (TF). Therefore, ETV6 could act as a transcriptional co-factor (2). In both situations, ETV6 can recruit its co-repressor complex to the chromatin (1-2). In childhood leukemia, the formation of the ETV6-AML1 chimera is often accompanied by deletion of the second non-translocated *ETV6* allele, leading to ETV6 inactivation. We postulate that, following ETV6 inactivation, there is an increase in the availability of consensus EBS, which can be recognized by other Ets transcription factors (ETS TF). This could increase transcription of the p53 isoforms. Furthermore, transcription factors become free of ETV6 and its co-repressor complex, leading to an increased transcriptional response (4).

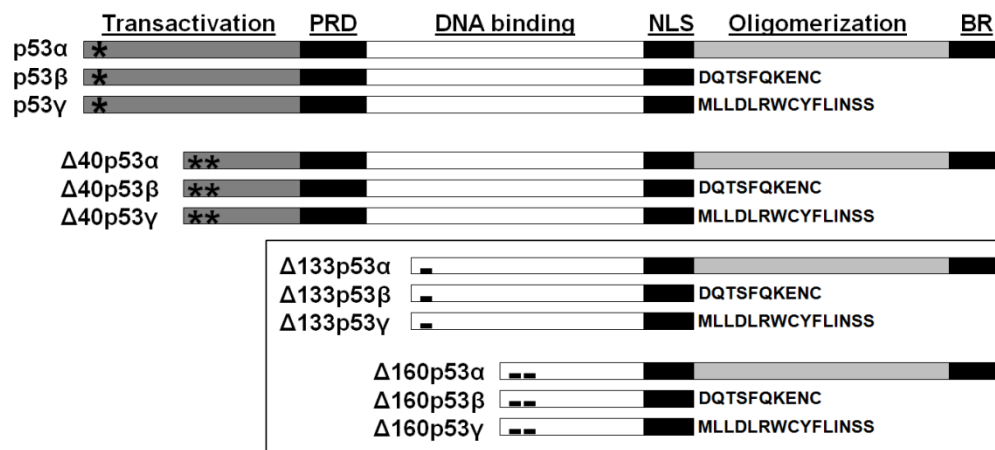
2.12. Figures and tables.

Figure 6. The expression of p53 and $\Delta 133$ p53 mRNA in the bone marrow of pre-B ALL patients.

A. The *TP53* gene organization.



B. p53 and $\Delta 133$ p53 proteins.



C. p53 and $\Delta 133$ p53 transcripts in childhood pre-B ALL.

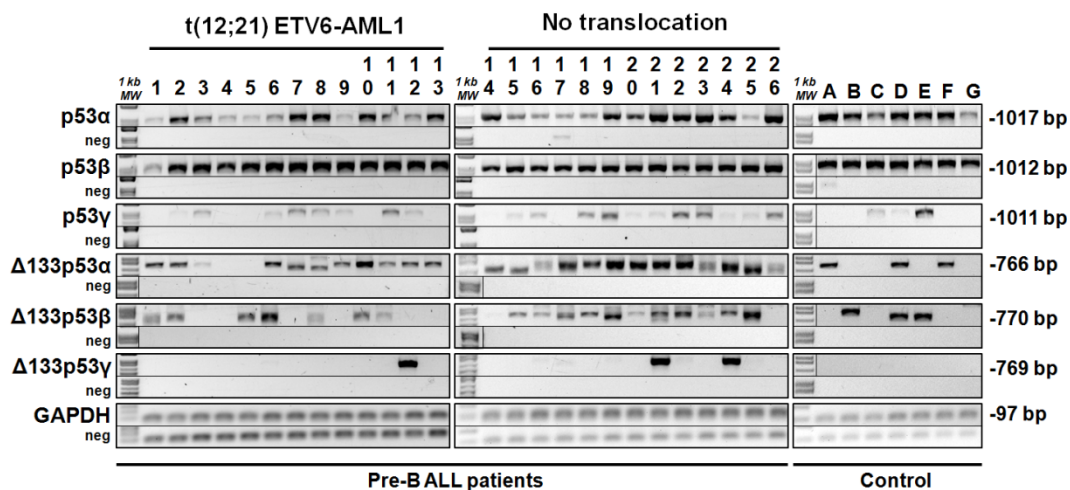


Table III. Genetic and clinical features of the cohort of pre-B ALL patients and normal individuals.

Patient (Cohort)	Cytogenetic		Gender	Age (month old)	Blast BM (%)	WBC count (10 ⁹ /L)	Platelet count (10 ⁹ /L)	Risk	Isoform expression	
	t 12; 21	LOH							p53	Δ133 p53
1 (410)	+	+	F	36	98.4	58.5	19.0	H	α-β	α-β
2 (683)	+	-	M	33	98.0	77.6	7.00	H	α-β-γ	α-β
3 (580)	+	+	F	52	96.5	35.3	20.0	S	α-β-γ	α
4 (443)	+	-	F	32	99.5	104	52.0	H	α-β	none
5 (587)	+	+	M	61	96.5	2.89	16.0	S	α-β	β
6 (400)	+	+	M	44	95.6	71.9	69.0	H	α-β-γ	α-β
7 (420)	+	+	M	57	97.5	127.	50.0	H	α-β-γ	α
8 (416)	+	+	M	36	86.0	40.8	158	H	α-β-γ	α-β
9 (375)	+	+	F	32	98.0	141.	87.0	H	α-β-γ	α
10 (392)	+	+	M	84	97.0	11.6	41.0	S	α-β	α-β
11 (411)	+	-	F	57	86.8	3.80	189	S	α-β-γ	α-β
12 (413)	+	-	F	40	83.2	29.2	65.0	S	α-β-γ	α-γ
13 (401)	+	+	M	39	79.5	3.30	222	S	α-β	α
14 (617)	-	-	F	46	92.7	23.6	17.0	S	α-β	α
15 (415)	-	-	F	46	89.0	119	19.0	H	α-β-γ	α-β
16 (579)	-	-	M	75	95.5	183	29.0	H	α-β-γ	α-β
17 (596)	-	-	F	22	96.5	23.2	9.00	H	α-β	α-β
18 (437)	-	-	M	151	92.0	1811	52.0	H	α-β-γ	α-β
19 (599)	-	-	M	88	100	10.2	66.0	H	α-β-γ	α-β
20 (394)	-	-	F	92	98.5	10.5	11.0	S	α-β-γ	α-β
21 (384)	-	-	M	102	93.5	3.10	220.	S	α-β-γ	α-β-γ
22 (387)	-	-	F	ND	ND	2.20	58.0	H	α-β-γ	α-β
23 (372)	-	-	M	99	87.0	2.10	74.0	S	α-β-γ	α-β
24 (362)	-	-	F	174	99.5	8.10	22.0	H	α-β-γ	α-β-γ
25 (365)	-	-	F	29	99.0	51.8	27.0	H	α-β-γ	α-β
26 (83)	-	-	M	89	95.0	41.8	451	S	α-β-γ	α
A	ND	-	ND	NA	ND	ND	ND	NA	α-β	α
B	ND	-	ND	NA	ND	ND	ND	NA	α-β	β
C	ND	-	ND	NA	ND	ND	ND	NA	α-β-γ	none
D	ND	-	ND	NA	ND	ND	ND	NA	α-β-γ	α-β
E	ND	-	ND	NA	ND	ND	ND	NA	α-β-γ	β
F	ND	-	ND	NA	ND	ND	ND	NA	α-β	α
G	ND	-	ND	NA	ND	ND	ND	NA	α-β	none

Patients 1 to 26, children diagnosed with pre-B acute lymphoblastic leukemia (pre-B ALL); Individuals A to G, control individuals; LOH, loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 12. The expression of ETV6 in all samples was verified by qPCR; Gender, male (M) or female (F); Age, in months old, at diagnosis; Blast

BM, distribution of leukemia blasts in the bone marrow (BM); WBC, white blood cell count, at diagnosis; RISK GROUP, defined according to the risk of relapse during treatment, high (H) or standard (S); Isoform expression, mRNA detected by nested PCR against the p53 isoforms; ND, not determined

Table IV. Fisher's exact test to compare the p53 γ , Δ 133p53 α and Δ 133p53 β mRNA expression between 26 pre-B ALL patients and 7 control individuals.

Isoform	Expression	Pre-B ALL patients (%)	Controls (%)	Bilateral p-value
p53 γ	+	19 (73)	3 (43)	0.1863
	-	7 (27)	4 (57)	
Δ 133p53 α	+	24 (92)	3 (43)	0.0108 *
	-	2 (8)	4 (57)	
Δ 133p53 β	+	18 (69)	3 (43)	0.3774
	-	8 (31)	4 (57)	

Pre-B ALL patients and control individuals were separated according to the expression status of p53 γ , Δ 133p53 α and Δ 133p53 β mRNA: expression (+), no expression (-). Bilateral p-value is presented: $p < 0.05$ (*)

Table V. Clinical features at diagnosis of pre-B ALL patients compared to the expression status of p53 γ , Δ 133p53 α and Δ 133p53 β mRNA.

Clinical feature	Isoform	Expression	Mean \pm S.D.	Bilateral p-value
Blast BM (%)	p53 γ	+	93.2 \pm 5.31	NS
		-	94.3 \pm 6.86	
	Δ 133p53 α	+	93.7 \pm 5.73	NS
		-	98.0 \pm 2.12	
	Δ 133p53 β	+	93.8 \pm 5.45	NS
		-	94.5 \pm 6.38	
Age (month old)	p53 γ	+	72.0 \pm 41.2	NS
		-	45.7 \pm 20.8	
	Δ 133p53 α	+	66.2 \pm 39.2	NS
		-	46.5 \pm 20.5	
	Δ 133p53 β	+	69.7 \pm 43.4	NS
		-	53.9 \pm 22.0	
WBC count (10 ⁹ /L)	p53 γ	+	60.0 \pm 61.4	NS
		-	32.4 \pm 36.8	
	Δ 133p53 α	+	52.5 \pm 57.1	NS
		-	53.4 \pm 71.4	
	Δ 133p53 β	+	48.9 \pm 58.6	NS
		-	60.1 \pm 54.6	
Platelet count (10 ⁹ /L)	p53 γ	+	88.1 \pm 106	NS
		-	53.7 \pm 75.8	
	Δ 133p53 α	+	82.6 \pm 102	NS
		-	34.0 \pm 25.5	
	Δ 133p53 β	+	61.7 \pm 63.6	NS
		-	118 \pm 150	

The distribution of leukemia blasts in the bone marrow (Blast BM), the age at diagnosis, the white blood cell/WBC count and the platelet count were compared according to the expression of p53 γ , Δ 133p53 α and Δ 133p53 β mRNA: expression (+), no expression (-). S.D.; standard deviation. Statistical differences were measured with a Kruskal-Wallis One Way ANOVA followed by a Dunn's multiple comparison test. Bilateral p-values are presented: p > 0.05 (NS), p < 0.05 (*), p < 0.01 (**) and p < 0.001 (***).

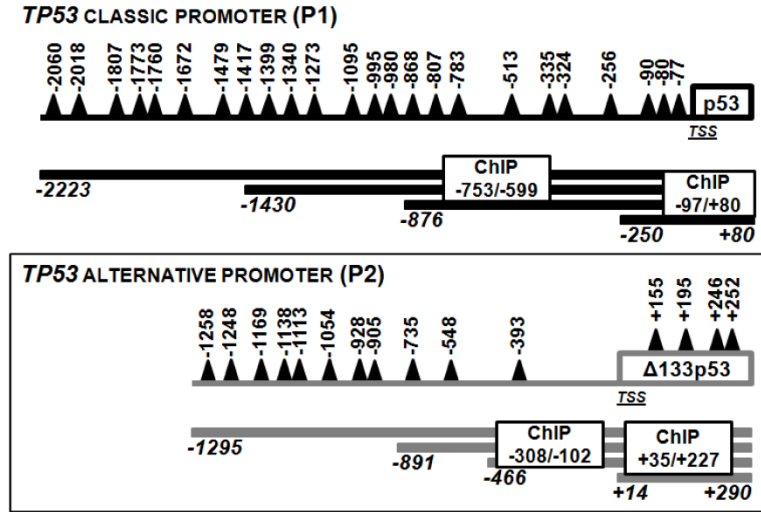
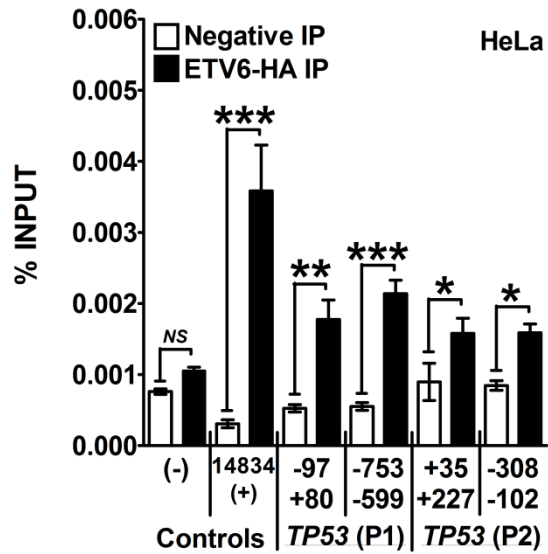
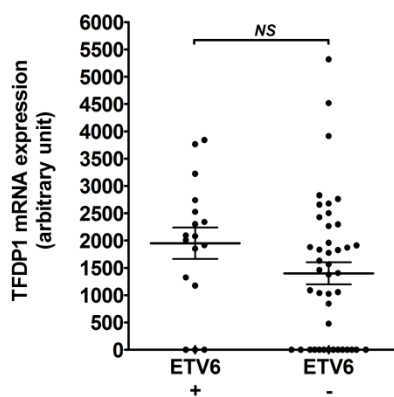
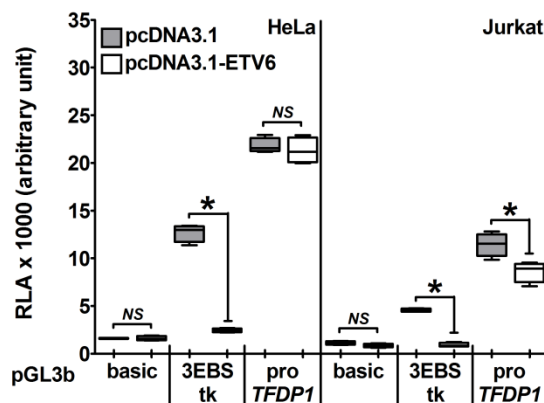
Figure 7. ETV6 binds the classic and alternative promoter of *TP53*.A. The *TP53* promoters and their predicted consensus EBS.B. ETV6 binds the classic and alternative promoters of *TP53*.

Figure 8. ETV6 alone can repress the activity of the *TP53* classic and alternative promoters.

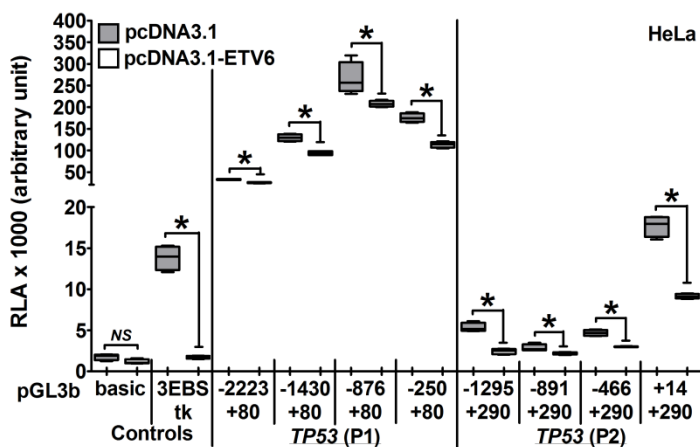
A. TFDP1 expression is not modulated by ETV6 in childhood pre-B ALL.



B. Experimental controls for the luciferase-reporter activity assays.



C. ETV6 regulates the *TP53* promoters' activities in HeLa cells.



D. ETV6 regulates the *TP53* promoters' activities in Jurkat cells.

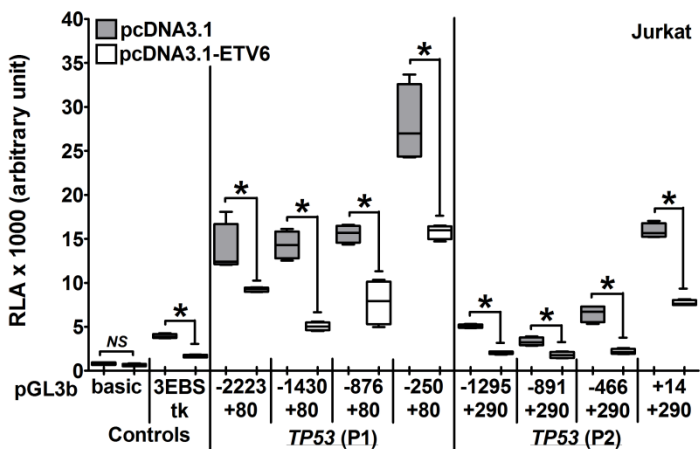
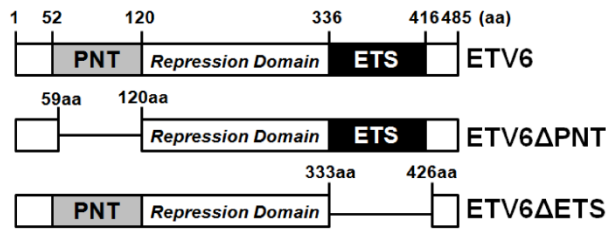
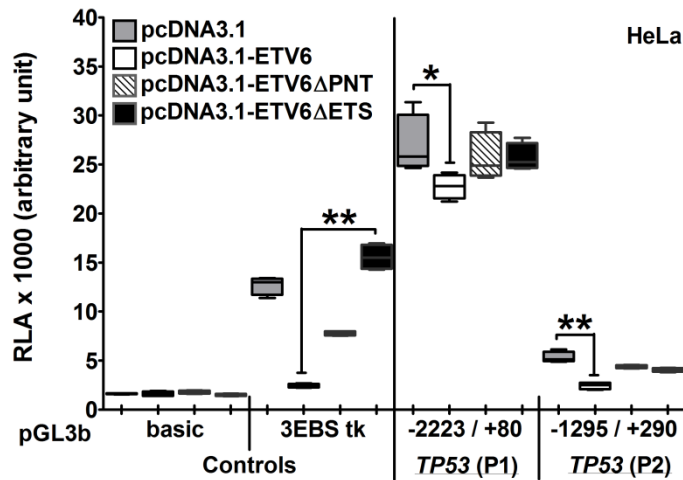


Figure 9. The Pointed and ETS domains are essential to the ETV6-mediated transcriptional regulation of the *TP53* promoters.

A. ETV6 and its truncated forms.



B. The PNT and ETS domains are involved during the ETV6-mediated transcriptional repression of the *TP53* promoters in HeLa cells.



C. The PNT and ETS domains are involved during the ETV6-mediated transcriptional repression of the *TP53* promoters in Jurkat cells.

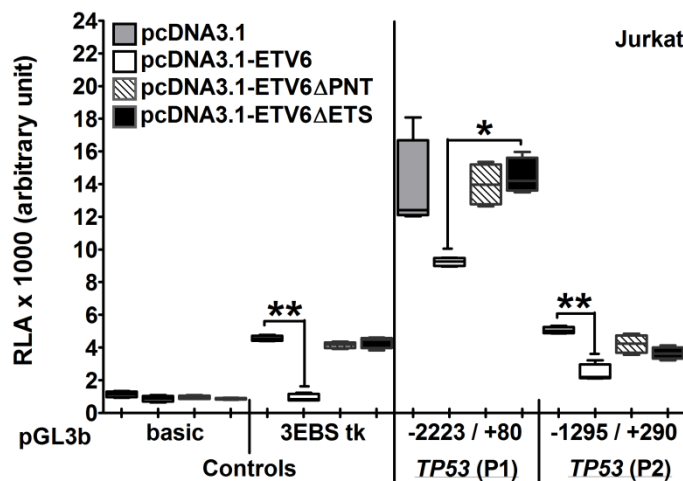


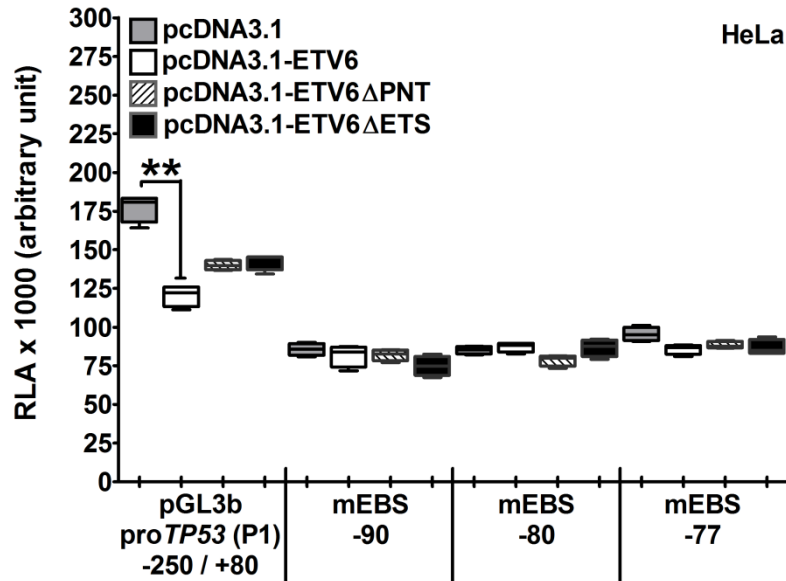
Table VI. Site-directed mutagenesis of the predicted consensus EBS located in the classic and alternative basal promoters of *TP53*.

EBS	Prediction	WT <u>mEBS</u>	Promoter residual activity after ETV6 overexpression	
			HeLa	Jurkat
proTP53 -250 to +80 (P1) ^{REF}			0.68 ± 0.02	0.56 ± 0.03
-90	ETS_Q6 ETS1P54_02	c <u>ca</u> tTTCCTtgc c <u>ca</u> tTTGGTtgc	0.95 ± 0.04 ***	0.58 ± 0.02
-80	ETS_Q6	gCTT <u>C</u> Ctc gCTT <u>G</u> Gtc	1.04 ± 0.02 ***	0.55 ± 0.05
-77	ETS1P54_03	tgcttcCTT <u>C</u> CGgcagg tgcttcCTT <u>G</u> GGgcagg	0.89 ± 0.06 ***	0.55 ± 0.04
proTP53 +14 to +290 (P2) ^{REF}			0.52 ± 0.02	0.52 ± 0.01
+155	TEL2_Q6 ETS1P54_01	cag <u>G</u> AGGTgc cac <u>C</u> AGGTgc	0.45 ± 0.01	0.46 ± 0.02
+195	ETS1P54_02	cgtcTT <u>C</u> CAggtg cgtcTT <u>G</u> GAgttg	0.52 ± 0.03	0.60 ± 0.07
+246	ETS_Q6	cCTT <u>C</u> Ctc cCTT <u>G</u> Gtc	0.50 ± 0.02	0.51 ± 0.03
+252	ETS_Q6	tCTT <u>C</u> Cta tCTT <u>G</u> Gta	0.61 ± 0.02	0.61 ± 0.05

Site-directed mutagenesis of predicted consensus Ets-binding site (EBS) located in the classic and alternative basal promoters of *TP53*. EBS; consensus EBS and position, according to the transcription start site (+1): Prediction; according to Transfac: WT; wild-type consensus EBS: mEBS; mutated consensus EBS: Promoter residual activity after ETV6 overexpression; a ratio between the relative luciferase activity when ETV6 is overexpressed versus the basal activity of the promoter (mean ± standard deviation). A Two-Way ANOVA with a Bonferroni post test was used to compare the statistical difference between the WT and the mEBS promoters. Bilateral p-values are indicated: p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), and p < 0.001 (***).

Figure 10. Consensus EBS are implicated in the transcription regulation of the *TP53* classic promoter.

A. In HeLa cells, consensus EBS are essential to the ETV6-mediated transcriptional repression of the *TP53* classic promoter.



B. The ETV6-mediated transcriptional repression can depend on the cellular context.

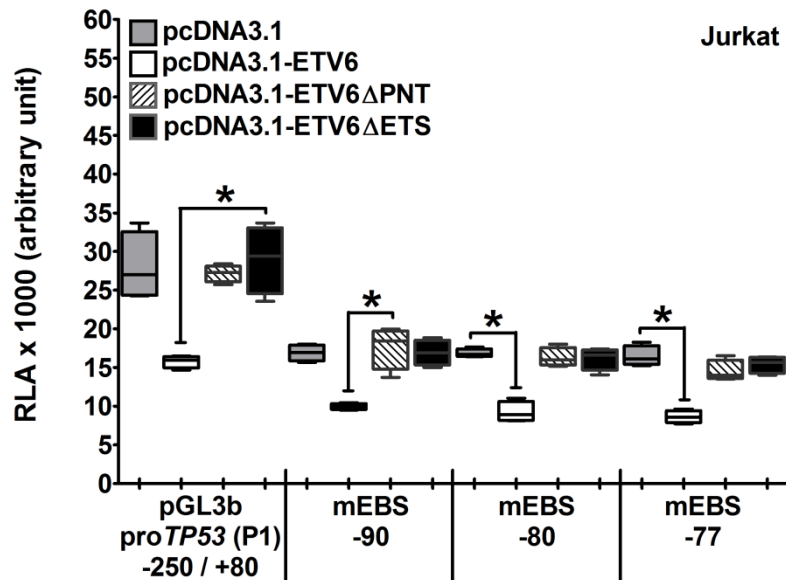
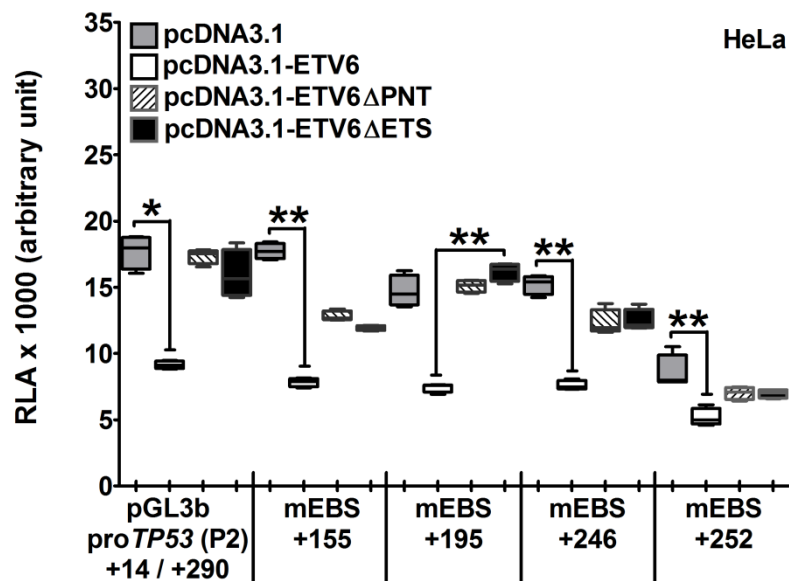


Figure 11. The ETV6-mediated transcriptional repression depends on the target promoter.

A. Consensus EBS are not involved during the transcriptional repression mediated by ETV6 on the *TP53* alternative promoter.



B. Depending of the target promoter, ETV6 can use different molecular mechanisms to regulate transcription.

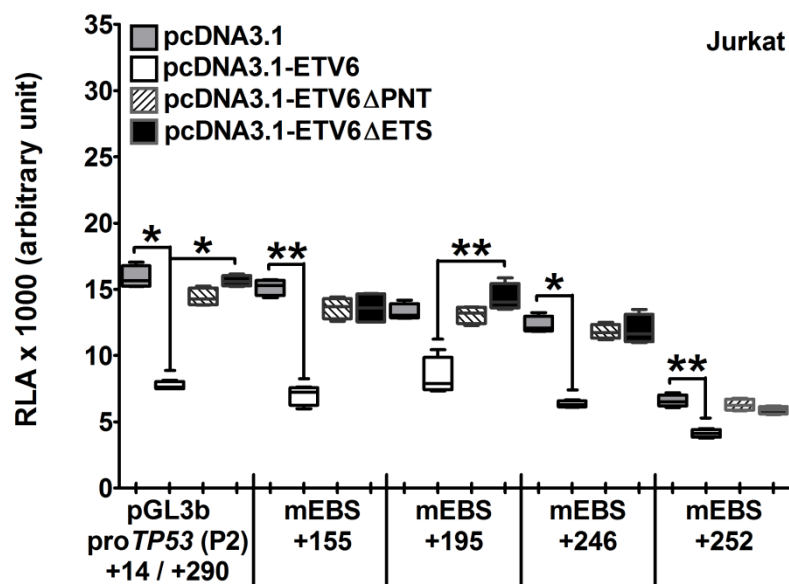
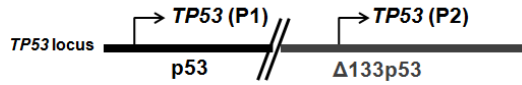


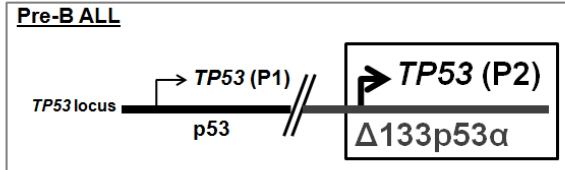
Figure 12. Proposed models for the transcriptional regulation of p53 and $\Delta 133p53$ isoforms by ETV6.

A. $\Delta 133p53\alpha$ could be upregulated in childhood pre-B ALL.

Physiological context

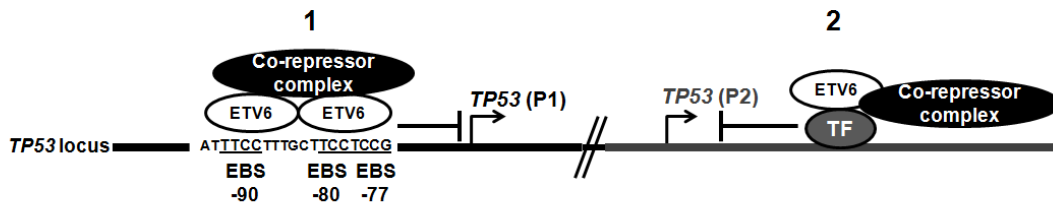


Pre-B ALL



B. ETV6-mediated transcriptional regulation of p53 and $\Delta 133p53$ isoforms.

ETV6 occupies the chromatin of both TP53 promoters to repress their activity.



When ETV6 is inactivated, chromatin regions become available to other transcription factors.

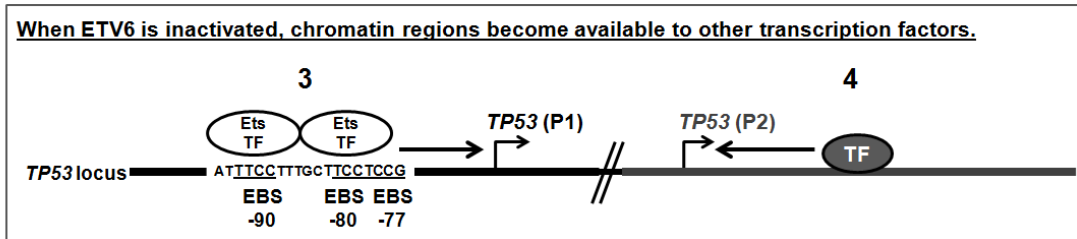


Table VII. Primers used for molecular cloning, site-directed mutagenesis, chromatin immunoprecipitation and nested PCR.

Name	Sequence (5' to 3')
Molecular cloning	
TP53-P1 -2223..F	agagacgcggtttccatctccacgaaggac
TP53-P1-1430..F	agagacgcggtcttctctgcaggaagg
TP53-P1-876..F	agagacgcggtccacctccgattgg
TP53-P1-250.GW.F	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctccctcatattgacacaatgcagg
TP53-P1+80.R	agagagatctggacggtggctctagactt
TP53-P1+80.GW.R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttgacggtggcactagactt
TP53-P2-1295.GW.F	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctacattggaagagagaatgtgaagc
TP53-P2-891.GW.F	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctggaaggacaagggttgggc
TP53-P2-466.GW.F	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcaatgcctggccgatcc
TP53-P2+14.GW.F	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctggaggctgcagtgagctgt
TP53-P2+290.GW.R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttgcaaaacatctgttgagggc
Site-directed mutagenesis	
TP53-P1.mEBS-90	tcccaactccatttggttgcttctccggcagg
TP53-P1.mEBS-80	tccgcctgccggaccaagcaaaggaaatgg
TP53-P1.mEBS-77	catttcttggcttctggggcaggcggattacttgccc
TP53-P2.mEBS+155	gctagtgggtgaccagggtgcttacgc
TP53-P2.mEBS+195	gctgccgtctggagttgctttatctgttcaactgtgccc
TP53-P2.mEBS+246	caactctgtctccttggcttctctacagtactcccctgc
TP53-P2.mEBS+252	caactctgtctccttctcttggtagactactcccctgc
ETV6.ΔPNT.Pacl	cacctgcgctgcagtttaattaactggagcagggatgac
ETV6.ΔPNT.Pacl	gtgctctatgaactcctcagcatttaattaagcagaggaaacctcgg
ETV6.ΔETS.KpnI	caggccatgccattggtaccatagcagactgtagactg
ETV6. ΔETS.KpnI	gttatgaaaacccagatggtaccatgagtgccgaacagac
Chromatin Immunoprecipitation	
TP53-P1.-753.F	ggctgctgggagttgtagtc
TP53-P1.-599.R	gacaggctgaagcctggag
TP53-P1.-97.F	tccatttcttggcttctc
TP53-P1.+80.R	tggacggtggctctagactt
TP53-P2.+35.F	atcacaccactgtgtccag
TP53-P2.+227.R	agtcagggcacaagtgaaca
TP53-P2.-308.F	ggctttatccatcccata
TP53-P2.-102.R	catgttaccaggctgtct
Negative.F	atggttgcactgggatct
Negative.R	tgccaaagcctaggggaaga
14834.Positive.F	ttgcccaatcatttcttct
14834.Positive.R	cctccatgtgactgacacg
Nested PCR	
p53.F1	gtcactgccatggaggagccgca
p53.F1	gacgcacacctattgcaagcaagggttc
Δ133p53.F1	ctgagggtgtagacgccaactctcttag
Δ133p53.R1	aatgtcagtctgagtcaggcccttctgtc
p53.F2	atggaggagccgcagtcagat
Δ133p53.F2	caactctcttagctcgctagtg
p53α.R2	ctcacgcccacggatctga
p53β.R2	tttgaaagctggctgtgctctga
p53γ.R2	tcgtaagtcaagtagcatctgaagg
GAPDH.F	gatcatcagcaatgcctc
GAPDH.R	tgtggtcatgagtccttcca

Name of the primer and their respective nucleotide sequences are indicated.

Chapitre 3. Deuxième article.

The transcriptional targets of ETV6 are involved in the development of childhood pre-B acute lymphoblastic leukemia

Cet article sera soumis au journal Genes & Development au mois de mars 2012.

3.1. Présentation du deuxième article.

L'inactivation complète du facteur de transcription ETV6 est un événement courant chez les enfants atteints de la LLA pré-B. Tel que mentionné précédemment, environ 70% des LLA pré-B pédiatrique t(12;21)+ présentent une délétion de l'allèle résiduel de *ETV6*. Ceci entraîne une perte d'expression permanente de ETV6 dans les lymphocytes pré-B leucémiques, suggérant que ETV6 agisse comme gène suppresseur de tumeur dans la LLA pré-B de l'enfant. Par contre, il existe très peu d'évidences démontrant le rôle des cibles transcriptionnelles de ETV6 dans le développement de la leucémie pédiatrique.

Les études réalisées dans notre laboratoire ont mené à l'identification de quatre gènes dont l'expression est modulée par ETV6: *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* et *LUM*. Ceci a été confirmé par des études de micropuces et de PCR quantitatif chez des cellules HeLa, mais également chez des échantillons tumoraux de moelle osseuse d'enfants atteints de la LLA pré-B.¹⁴⁹ Nous avons d'abord mené des études de régulation transcriptionnelle, de façon similaire à celles menées avec *TP53*, pour confirmer que les gènes *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* et *LUM* sont des cibles transcriptionnelles de ETV6. Ceci a été fait par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ainsi que des essais luciférases qui ont permis de confirmer que *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* et *LUM* sont des cibles transcriptionnelles directes de ETV6. La régulation transcriptionnelle médiée par ETV6 se faisait dans une région près du promoteur de base. De façon similaire aux isoformes de TP53, ETV6 utilise des mécanismes moléculaires qui dépendent du promoteur régulé et du contexte cellulaire.

Des études fonctionnelles dans les lymphocytes pré-B leucémiques Reh ont permis de valider le rôle des gènes *SPHK1*, *IL-18* et *PTGER4* dans la leucémogénèse pédiatrique. Nous avons mesuré l'impact d'une modulation de l'expression de ces cibles transcriptionnelles d'ETV6 au niveau de la prolifération cellulaire, l'apoptose induite par un stress génotoxique et de la migration cellulaire à travers la voie signalétique CXCL12/CXCR4. Nous avons démontré que le niveau d'expression des gènes *SPHK1*, *IL-18* et *PTGER4* influence la survie et la prolifération cellulaire, mais également la sensibilité du lymphocyte pré-B leucémique à la migration cellulaire dirigée par la voie CXCL12/CXCR4. Cette étude montre que les cibles transcriptionnelles de ETV6 sont impliquées dans le leucémogénèse pédiatrique.

Pour cet article, Camille Malouf a mené les expériences de PCR, de sous-clonage moléculaire, de mutagenèse dirigée, de prolifération cellulaire, de cycle cellulaire, d'apoptose et de migration cellulaire. Elle a également réalisé les figures et tableaux et rédigé le manuscrit. Sylvie Langlois a mené les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine. Josiane Larose a contribué à la réflexion scientifique. Ekaterini A. Kritikou a révisé le manuscrit. Daniel Sinnett est l'investigateur principal du projet. Cet article sera soumis au Journal *Genes & Development* au mois de mars 2012.

The transcriptional targets of ETV6 are involved in the development of childhood pre-B acute lymphoblastic leukemia

Camille Malouf¹⁻², Sylvie Langlois¹, Josiane Larose¹, Ekaterini A. Kritikou¹ and Daniel Sinnett¹⁻³

¹ Division of Hemato-Oncology, Research Center Sainte-Justine University Health Center, Montreal, Canada H3T 1C5 ; ² Department of Biochemistry, and ³ Department of Paediatrics, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Canada, H3T 1C5

Corresponding address:

Daniel Sinnett

Research Center Sainte-Justine University Health Center

3175 chemin de la Côte Ste-Catherine

Montreal (Quebec) Canada, H3T 1C5.

Phone: +1 514 345-4931 ext. 2990.

Fax : +1 514 345-4731.

Short title: SPHK1, IL-18, PTGER4 and LUM are regulated by ETV6.

Keywords: Childhood acute lymphoblastic leukemia / ETV6 / Transcriptional target / Promoter / Functional studies

3.2. Abstract.

Pre-B Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) represents ~25% of all paediatric cancer cases. One of the most frequent genetic alteration that has been associated with pre-B ALL is the t(12;21) translocation, which results in the formation of the ETV6-AML1 chimera. The frequent deletion of the residual allele of *ETV6* then leads to the complete inactivation of ETV6, a transcriptional repressor of the ETS family of transcription factors with very few known target genes. We previously identified four genes whose expressions are modulated by the expression of ETV6 in pre-B ALL patients: sphingosine kinase 1 (*SPHK1*), interleukin-18 (*IL-18*), prostaglandin E2 receptor EP4 subtype (*PTGER4*) and lumican (*LUM*). Using gene reporter assays and chromatin immunoprecipitation experiments, we demonstrate that *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM* are transcriptional targets of ETV6. To repress transcription, ETV6 uses both functional domains (PNT and ETS) and recognizes Ets-Binding Sites in a cell specific manner. Functional studies in Reh leukemia cells show the implication of SPHK1, IL-18 and PTGER4 in their survival, proliferation and migration. This study is one of the first to elucidate the role of the ETV6 transcriptional targets in childhood leukemogenesis.

3.3. Introduction.

Cancer is the leading cause of death by disease in the population aged between 1 and 14 years old (Jemal et al. 2010). Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent paediatric cancer, accounting for ~25% of all pediatric tumours (Linabery and Ross 2008). Around 85% of ALL patients will present a massive proliferation of leukemia precursor B cells in the bone marrow (pre-B ALL). Pre-B ALL has been associated with many genetic abnormalities during the past two decades, including many chromosomal translocations (Pui et al. 2011). The t(12;21) translocation is the most common genetic aberration in childhood pre-B ALL, occurring in 25% of pre-B ALL cases (Rabbitts 1991; Ferrando and Look 2000; O'Neil and Look 2007). This leads to the formation of the ETV6-AML1 chimera, an in-frame fusion of an ETV6 (erythroblast transformation-specific variant 6) allele with an allele of AML1 (acute myeloid leukemia 1) (Ford et al. 1998) The expression of the ETV6-AML1 chimera is under the control of the ETV6 promoter, which leads to the expression of a chimeric transcription factor with the NH₂-terminal part of ETV6 and almost the complete AML1. Although this translocation constitutes a first step in leukemogenesis, additional steps are required for leukemia initiation (van der Weyden et al. 2011). Studies in transgenic mice (Andreasson et al. 2001; Morrow et al. 2004; Tsuzuki et al. 2004; van der Weyden et al. 2011), zebrafish (Sabaawy et al. 2006) and humanized NOD/SCIDy mice transplanted with cord blood (Hong et al. 2008) have clearly shown that the ETV6-AML1 translocation is not sufficient to promote the development of pre-B ALL. Therefore, other genetic abnormalities are required to initiate leukemogenesis. The non-translocated *ETV6* allele is inactivated through deletion

in 70-90% of pre-B ALL cases carrying the t(12;21) translocation (Montpetit et al. 2002; Montpetit et al. 2004; Lilljebjorn et al. 2010). Several lines of evidence indicate that the inactivation of ETV6, through loss of its expression, is the initiating event in leukemogenesis of ALL. The expression of ETV6 is absent in patients that harbour the ETV6-AML1 translocation (Montpetit et al. 2004; Zuna et al. 2004). Thus the complete inactivation of ETV6, through loss of its expression, is required for leukemogenesis (Montpetit et al. 2002; Patel et al. 2003; Anderson et al. 2011).

ETV6 is a ubiquitously expressed transcription factor of the Ets family (Poirel et al. 1997). Unlike most Ets transcription factors that function as transcriptional activators, ETV6 has been shown to function as a transcriptional repressor (Lopez et al. 1999). ETV6 is essential for embryonic development as it is involved in hematopoiesis of the bone marrow (Wang et al. 1998). ETV6-knockout in mice is embryonic lethal due to severe defects in the vascular network of the yolk sac (Wang et al. 1998). This transcription factor is also required for the survival of hematopoietic stem cells and negatively regulates hematopoietic precursor differentiation (Hock et al. 2004).

ETV6 has a C-terminal ETS DNA-binding domain, which is also important for protein-protein interactions and a pointed (PNT) helix-loop-helix domain (Lopez et al. 1999). The ETS domain has been shown to recognize a consensus Ets-binding site (EBS), which consists of a core GGAA/T sequence with adjacent rich purine sequences (Bohlander 2005). All 29 Ets factors reported today have an ETS domain. The PNT domain is involved in the interactions of Ets transcription factors with other proteins (Bohlander 2005). Unlike other Ets proteins, ETV6 can homodimerize *in vivo* via its PNT domain. In fact, homodimerization is required for

its transcriptional repression activity. The central domain of ETV6 is also implicated in protein-protein interactions with members of the SMRT/N-CoR/mSin3A/HDAC-repressing complexes (Chakrabarti and Nucifora 1999; Guidez et al. 2000; Kwiatkowski et al. 2000; Kuwata et al. 2002; Nordentoft and Jorgensen 2003; Putnik et al. 2007).

To better understand the physiological and pathophysiological role of ETV6 in the initiation and progression of leukemia, it is necessary to identify its downstream target genes. Very few transcriptional targets of ETV6 are currently known: *MCSFR* (macrophage colony-stimulating factor receptor) (Fears et al. 1997), *GpIb α* and *GpIX* (platelet glycoprotein Ib alpha chain and IX) (Kwiatkowski et al. 1998), *stromelysin-1/MMP-3* (matrix metalloprotein-3) (Fenrick et al. 2000) and the anti-apoptotic protein *BCL-X_L* (Irvin et al. 2003). We recently identified four transcripts with an expression pattern that significantly correlated with the expression of ETV6 in pre-B ALL: *SPHK1* (sphingosine kinase 1), *IL-18* (interleukin-18), *PTGER4* (prostaglandin E2 receptor EP4 subtype) and *LUM* (lumican) (Boily et al. 2007).

In the present study, we investigated the transcriptional regulation mediated by ETV6 on the proximal promoters of *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM* using chromatin immunoprecipitation and gene reporter assays. We show that *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM* are direct transcriptional targets of ETV6. The ETV6-mediated transcriptional regulation takes place in a region close to the basal promoter and, depending on the promoter and the cellular context, may require consensus EBS. We also performed functional studies to understand the role of these novel ETV6 transcriptional targets in leukemogenesis: cellular proliferation

and survival, cell cycle, DNA damage-induced apoptosis and cellular migration through the CXCL12/CXCR4 signalling pathway. We show that a deregulated expression of SPHK1, IL-18 and PTGER4 can influence one or more of these biological pathways and, consequently, influence childhood leukemogenesis. This study is one of the first to propose the implication of the ETV6 transcriptional targets in the pathophysiology of pre-B ALL.

3.4. Results.

***SPHK1, IL-18, PTGER4* and *LUM* are direct transcriptional targets of ETV6.**

We have previously shown a correlation between the expression of ETV6 and that of *SPHK1, IL-18, PTGER4* and *LUM* in the tumour material of pre-B ALL patients, which indicated that these genes might be transcriptional targets of ETV6 (Boily et al. 2007). In fact, the Transfac tool predicted many consensus EBS in the proximal promoters of these genes (FIG. 13A) (Matys et al. 2006). As a negative control for the chromatin immunoprecipitation assay in HeLa cells, we used a region located in the chromosome-associated protein D2 (*NCAPD2*) gene on chromosome 12, whereas the positive control named “14834”, maps to the proximal promoter of the activator of basal transcription 1 (*ABT1*) gene (Figure 13B). We show that ETV6 can bind different regions of the proximal and basal promoters of *SPHK1, IL-18, PTGER4* and *LUM* (FIG.13B). Because the basal promoter of *SPHK1* is GC-rich, we were not able to measure the ETV6 enrichment in this chromatin region.

Next, we examined the ETV6-dependent promoter activity of these genes using gene reporter assays in HeLa cells. Since ETV6 is ubiquitously expressed, we also used another cell model: Jurkat cells. We subcloned the coding sequence of ETV6 into the pcDNA3.1 expression vector. This vector was cotransfected with our reporter gene constructs: pGL3b vector with the human promoter (Firefly luciferase) and the pRL-CMV vector as an internal control (Renilla luciferase). As a control of the ETV6-mediated transcriptional repression, we used an artificial promoter (3EBStk) containing three consensus EBS located upstream of the thymidine kinase promoter. Following ETV6 overexpression, the activity of 3EBStk

was significantly reduced in both HeLa (FIG. 20A-21A-22A-23A) and Jurkat cells (FIG. 20A-21A-22A-23A). Furthermore, according to a ChIP-chip study conducted in our laboratory, ETV6 cannot bind the *TFDP1* promoter (data not shown) and ETV6 overexpression does not affect the expression or promoter activity of the *TFDP1* gene (Malouf et al. in preparation). These experimental controls confirm that our experimental design can identify transcriptional targets of ETV6 in a specific manner.

We subcloned the proximal promoters of *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM* to generate promoter constructs ranging from 300 to 2000 bp (FIG. 13A). Different regions of the human promoters were inserted upstream of the Firefly luciferase gene present in the pGL3-basic vector. Each promoter was generated by PCR amplification, followed by subcloning into the pGL3b vector. The gene reporter assays in HeLa (FIG. 20A-21A-22A-23A) and Jurkat cells (FIG. 20B-21B-22B-23B) confirm that *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM* are transcriptional targets of ETV6, as ETV6 overexpression significantly reduced the activity of all the promoter constructs studied. This data is in agreement with our previous results showing a correlation of *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM* expression following ETV6 overexpression (Boily et al. 2007).

We then narrowed down the promoter region targeted by ETV6 to a region close to the basal promoter. For the *SPHK1* promoter, the ETV6-mediated transcriptional repression was significant in all *SPHK1* promoters tested: -858/+115, -617/+115, -351/+115 and -168/+115 (FIG. 20). In HeLa cells, the basal activity of the *SPHK1* promoter -168/+115 was approximately 3 fold higher than the *SPHK1* promoter -858/+115, suggesting that the -858/-168 region contains

repressive regulatory elements (FIG. 20A). This difference was not seen in Jurkat cells, suggesting that the *SPHK1* promoter's transcriptional regulation is cell-specific (FIG. 20B). However, in both HeLa and Jurkat cells, the *SPHK1* promoter -168/+115 is regulated by the ETV6 transcription factor.

The *IL-18* promoter was also regulated by ETV6 in all its promoters tested: -1807/+185, -1110/+185, -667/+185, -311/+185 and -174/+79 (FIG. 21). The basal activity of all the *IL-18* promoters was similar in both HeLa cells (FIG. 21A) and Jurkat cells (FIG. 21B). The ETV6-mediated transcriptional repression was taking place in the -174/+79 region of the *IL-18* proximal promoter.

For the *PTGER4* promoter, ETV6 could repress the transcription in all the promoters tested: -855/+601, -855/+387, -855/+178 and -337/+178 (FIG. 22). In both HeLa (FIG. 22A) and Jurkat cells (FIG. 22B), the basal activity of the *PTGER4* promoter -855/+178 was 2-6 fold higher compared to the *PTGER4* promoter -855/+601, suggesting that the +178/+601 region contains repressive regulatory elements to the transcription of the *PTGER4* gene. Similar to the *SPHK1* and *IL-18* promoters, we identified a region close to the basal promoter of *PTGER4*, -337/+178, that was sufficient to the ETV6-mediated transcriptional repression.

The *LUM* promoter is also regulated by ETV6, according to the gene reporter assays. Overexpression of ETV6 decreases significantly the activity of all the *LUM* promoters tested: -829/+332, -583/+332 and -411/+332 (FIG. 23). The promoter deletions of *LUM* did not affect its activity in HeLa cells (FIG. 23A). However, in Jurkat cells, the *LUM* promoter -829/-583 appears to contain positive regulatory elements, whereas the -583/-411 region contains negative regulatory elements (FIG. 23B). The transcriptional regulation of the *LUM* promoter would

vary according to the cellular context. Similar to the other genes, the ETV6-mediated transcriptional repression takes place in a region close to the LUM basal promoter: -411/+332. Globally, these experiments confirm that *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM* are direct transcriptional targets of the ETV6 transcription factor and that ETV6 repress the transcription in a region close to the basal promoter.

The ETV6-mediated transcriptional repression requires the PNT and ETS functional domains.

Previous studies on transcriptional targets of ETV6 have shown that ETV6 needs the PNT and ETS functional domains to repress transcription (Fears et al. 1997; Fenrick et al. 2000; Kwiatkowski et al. 2000; Irvin et al. 2003). We decided to study the role of the ETV6 functional domains on the transcriptional repression of *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM* using gene reporter assays in HeLa cells. Using site-directed mutagenesis, we removed the PNT and ETS functional domains separately from the *ETV6* coding sequence located in the pcDNA3.1 vector: ETV6 Δ PNT and ETV6 Δ ETS (FIG. 14A). We found that the ETV6-mediated transcriptional repression is more efficient when both the PNT and ETS functional domains are available (FIG. 14B). A One-Way ANOVA confirmed that an overexpression of ETV6 leads to a higher transcriptional repression of the proximal promoters tested - *IL-18* promoter -1807/+185, *PTGER4* promoter -855/+601 and *LUM* promoter -829/+332 - compared to the ETV6 Δ PNT or ETV6 Δ ETS (Fig. 14B). We also noted that an overexpression of ETV6 Δ PNT or ETV6 Δ ETS diminishes the activity of the *IL-18* promoter -1807/+185, the *PTGER4* promoter -855/+601 and the *LUM* promoter -829/+332. This suggests that the ETV6 central repression

domain, involved in the recruitment of the SMRT/N-CoR/mSin3A/HDACs repressing complexes, participates in the transcriptional repression of the *IL-18*, *PTGER4* and *LUM* promoters. For the *SPHK1* promoter -858/+115, a Kruskal-Wallis One-Way ANOVA measured a statistical difference between the promoter's activity when ETV6 is overexpressed compared to the mutant ETV6 Δ ETS (FIG. 14B). Therefore, the ETS domain is also important to the transcriptional repression mechanisms of the ETV6 protein. The same experiment was conducted in Jurkat cells (FIG. 14C). Similarly, we found that an overexpression of ETV6 leads to a higher transcriptional repression of the promoters tested – *SPHK1* promoter -858/+115, *IL-18* promoter -1807/+185, *PTGER4* promoter -855/+601 and *LUM* promoter -829/+332 – compared to the overexpression of ETV6 Δ PNT or ETV6 Δ ETS. Overall, our results show that the ETV6-mediated transcriptional repression is efficient when the PNT and ETS functional domains are together.

ETV6 recognizes consensus EBS to repress transcription, but it depends on the cellular context.

Some members of the Ets family like ETS1 and FLI-1 mediate transcriptional regulation by binding to a consensus EBS (Kwiatkowski et al. 1998; Landry et al. 2005). The mutation of the EBS core GGAA/T to CCAA/T is sufficient to eliminate a consensus EBS (Starck et al. 1999). Using site-directed mutagenesis, we tested this hypothesis by mutating all the consensus EBS sites located in the basal promoters of *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM*. Multiple primers were used to conduct the mutagenesis reactions, which led to one or more EBS cores mutations in the studied promoters. These consensus EBS were

predicted using the Transfac bioinformatics tool that identifies putative transcription factor binding sites (Matys et al. 2006). The implication of a consensus EBS during the ETV6-mediated transcriptional repression was assessed using gene reporter assays in HeLa cells and Jurkat cells. This experimental approach considers the biological environment of the cell (e.g. expression of other transcription factors from the Ets family), which can be a determinant factor to the molecular mechanisms used by ETV6 to regulate transcription.

The *SPHK1* promoter -168/+115 possess four putative consensus EBS: EBS-158, EBS-104, EBS-84 and EBS+60. In HeLa (FIG. 24A) and Jurkat cells (FIG. 24B), overexpression of ETV6 leads to a significant transcriptional repression of the mutated *SPHK1* promoters: mEBS-158, mEBS-104, mEBS-84 and mEBS+60. To assess if the level of transcriptional repression was similar between the wild-type *SPHK1* promoter and its mutated forms, we calculated the residual activity for each promoter after ETV6 overexpression and conducted a Two-Way ANOVA analysis with a Bonferroni post test (Table VIII). This showed that the EBS-158, EBS-104 and EBS+60 participate to the ETV6-mediated transcriptional repression of the *SPHK1* promoter, only in HeLa cells (FIG. 24A). A similar trend was observed for the *IL-18* and *PTGER4* promoters. The *IL-18* promoter -174/+79 has four predicted consensus EBS: EBS-157, EBS-79, EBS-3 and EBS+61. In both HeLa (FIG. 25A) and Jurkat cells (FIG. 25B), ETV6 overexpression led to a significant transcriptional repression of the mutated *IL-18* promoters: mEBS-157, mEBS-79, mEBS-3 and mEBS+61 and mEBS-157/-79/-3. In HeLa cells, the mutation of EBS-157/-79/-3 together diminished the transcriptional effect of ETV6 on the *IL-18* basal promoter (Table VIII). The *PTGER4* promoter -337/+178 has 6

predicted consensus EBS: EBS-305, EBS-97, EBS-92, EBS-55, EBS-49 and EBS+35. ETV6 overexpression diminishes significantly the *PTGER4* promoters' activities in HeLa (FIG. 26A) and Jurkat cells (FIG. 26B): mEBS-305, mEBS-97/-92, mEBS-55/-49 and mEBS+35. However, in HeLa cells, the mutation of EBS-97/-92 together or EBS -55/-49 together is not favourable to the ETV6-mediated transcriptional repression of the *PTGER4* promoter (Table VIII). Whether ETV6 can bind chromatin directly through a different DNA-binding motif or indirectly through a transcription factor or co-factor remains to be determined.

The *LUM* promoter -411/+332 has four consensus EBS: EBS-152, EBS-126, EBS+13 and EBS+277. In HeLa cells (FIG. 27A) and Jurkat cells (FIG. 27B), ETV6 overexpression diminishes the *LUM* promoters' activities: mEBS-126, mEBS+13, mEBS-126/+13, mEBS+277, mEBS-152/+27. By mutating the EBS-152 and EBS+277 together, we abrogated the ETV6-mediated transcriptional repression of the *LUM* promoter in Jurkat cells only (Table VIII). These results show that ETV6 can recognize one or more consensus EBS to repress the activity of the *LUM* promoter, but this molecular mechanism can depend on the cellular context. ETV6 may select its target consensus EBS according to the presence and/or absence of other Ets factors that compete for the same DNA-binding site.

SPHK1 is a positive regulator of leukemia cell survival, proliferation and migration through the CXCL12/CXCR4 pathway.

We have previously shown that the expression of *SPHK1*, *IL-18* and *PTGER4* is modulated by ETV6 in pre-B ALL (Boily et al. 2007). To investigate the role of the ETV6 target genes during leukemogenesis, it is necessary to conduct functional

studies in an appropriate cellular model. We used the Reh cells, a pre-B leukemic cell line that harbour the t(12;21) and lack ETV6 expression (Greaves et al. 1978; Tsuzuki et al. 2007). By modulating the expression of the ETV6 target genes, we measured their implication in various biological pathways including cell proliferation and survival, DNA damage-induced apoptosis and cell migration through the CXCL12/CXCR4 pathway.

SPHK1 is endogenously expressed in Reh cells. To diminish the expression of SPHK1, we used two small hairpin RNAs: shRNA SPHK1-A and -B. We also used the scrambled sequence of the shRNA SPHK1-B as a negative control. Both shRNA were introduced downstream the U6 promoter present in the lentiviral vector pLKO.1. Reh cells were infected with the lentivirus harboring the shRNA construct, followed by a puromycin selection to enrich the infected cells. Using quantitative PCR, we observed a knockdown of 37% at the SPHK1 mRNA level for both shRNA (SPHK1-A and SPHK1-B), compared to control (FIG. 15A). This silencing was also confirmed by Western blot, which revealed a residual expression of 58% (FIG. 15B).

The survival and proliferative properties of Reh cells were measured using the WST1 colorimetric assay. Cells were seeded in a culture medium with 10% of foetal bovine serum and were allowed to proliferate for a period of 5 days. The down-regulation of SPHK1 expression resulted in a slower proliferation of Reh cells, compared to control (FIG. 15C). We also analyzed the cell cycle distribution of synchronized Reh cells over a period of 24-hours (Figure 28A). A double-staining was used to quantify the distribution of Reh cells into the S phase (BrdU-FITC positive cells) and the 7-AAD staining of the total DNA content discriminated

Reh cells in the G0/G1 or G2/M phases. The down-regulation of SPHK1 expression in Reh cells does not alter the cell cycle distribution on a 24-hour period, compared to control (FIG. 28B). Therefore, SPHK1 plays a positive role in the long-term proliferation and survival of leukemia cells.

SPHK1 is a lipid kinase that transforms sphingosine into sphingosine-1-phosphate (S1P). S1P is a positive regulator of cellular proliferation, but also a negative regulator of apoptosis (Cuvillier et al. 1996). To our knowledge, the role of SPHK1 during DNA damage-induced apoptosis has not been investigated in Reh cells. We induced the formation and accumulation of DNA double-strand breaks into the genome of Reh cells using a 4 hour treatment with camptothecin, a DNA topoisomerase-II inhibitor. This treatment activated the apoptosis of Reh cells from 3.4% (mock) to 18.7% (camptothecin treatment) (FIG. 29). When the expression of SPHK1 was decreased, Reh cells were more sensitive to the DNA damage-induced apoptosis compared to control (FIG. 15D). The down-regulation of SPHK1 was also accompanied by a diminution of cellular viability and a higher distribution of necrotic Reh Cells (FIG. 15D). Our results confirm the role of the SPHK1 lipid kinase during the DNA damage-induced apoptosis of leukemia cells.

Pre-B leukemia cells express the CXCR4 receptor, a G protein coupled receptor that responds to the CXCL12 chemokine. This signalling pathway is responsible for the homing of hematopoietic stem cells (HSC) to the bone marrow (Lapidot 2001). However, normal pre-B cells do not express CXCR4. Using a transmigration assay, we investigated the role of SPHK1 expression in the migration of Reh cells through the CXCL12/CXCR4-signalling pathway. The down-regulation of SPHK1 reduced the migration of Reh cell at a concentration of

CXCL12 0.10 nM (FIG 15E). Therefore, the expression of SPHK1 is favourable to the migration of leukemia cells through the CXCL12/CXCR4 signalling pathway.

IL-18 is a positive regulator of leukemia cell migration through the CXCL12/CXCR4 signalling pathway.

The expression of IL-18 pro-inflammatory cytokine in Reh cells is very low, so we overexpressed IL-18 through a lentiviral vector harboring the IL-18 coding sequence: pLenti-IL-18. As a negative control, we used the empty lentiviral vector: pLenti. Through quantitative PCR, we observed a high expression of IL-18 mRNA in Reh cells expressing pLenti-IL-18, compared to Reh cells expressing empty pLenti (FIG. 16A). The mature form of IL-18, which has a molecular weight of 18.0 kDa, was detected in the total protein extract of Reh cells by Western blot (FIG. 16B). Reh cells were also able to secrete IL-18 in their extracellular environment, as measured by ELISA (FIG. 16C). Since a similar experimental approach did not lead to LUM expression in Reh cells, so we did not investigate its influence of Reh cell proliferation, survival and migration.

The overexpression of IL-18 in Reh cells did not affect the cell proliferation and survival over a period of 5 days (FIG. 16D). Similarly, the cell cycle distribution of synchronized Reh cells over a period of 24-hours is not affected by the overexpression of IL-18 (FIG. 28C). Therefore, Reh cells are resistant to the IL-18-induced cell proliferation observed in natural killer cells (Tomura et al. 1998), even though the IL-18 receptor subunits are expressed in leukemia cells lines derived from pre-B ALL patients (Nakamura S et al. 2000). In adherent bone marrow cells, IL-18 facilitates the apoptotic process (Kitaura et al. 2006). After a 4-hour treatment

to camptothecin, Reh cells overexpressing IL-18 were more prone to enter apoptosis than their normal counterpart (FIG. 16E). Hence, IL-18 can moderately activate the DNA damage-induced apoptotic response of leukemia cells.

We also measured the effect of IL-18 on the Reh cell migration through the CXCL12/CXCR4 signalling pathway. Overexpression of IL-18 led to a higher cellular migration at a concentration of CXCL12 10.00 nM (FIG. 16F). To our knowledge, this is the first experimental evidence to propose a role of IL-18 in the process leading to the CXCL12/CXCR4-mediated homing of hematopoietic cell to the bone marrow. The pro-inflammatory cytokine IL-18 could favour the retention of pre-B leukemia cells in the bone marrow during the early steps of the disease.

The expression of PTGER4 is favourable to leukemia cells proliferation and survival and to their migration through the CXCL12/CXCR4 signalling pathway.

PTGER4, a G_s protein coupled receptor responding to prostaglandin E2, is endogenously expressed in Reh cells. Therefore, we used two distinct shRNA to reduce the expression of PTGER4 in Reh cells (PTGER4-C and -D). As a negative control, we used the scrambled version of the shRNA PTGER4-C. Compared to control, quantitative PCR showed a 49% or 68% knockdown of PTGER4 mRNA level in Reh cells expressing the shRNA PTGER4-C or PTGER4-D, respectively (FIG. 17A). This silencing was also confirmed by Western blot, which revealed a residual expression of 50% and 25% for shRNA PTGER4-C and PTGER4-D, respectively (FIG. 17B).

The down-regulation of PTGER4 expression led to a slower proliferation rate of Reh cells (FIG. 17C). This trend was consistent with the level of expression of PTGER4. Similar to our previous observations, the cell cycle distribution of synchronized Reh cells over a period of 24-hours did not vary according to the expression level of PTGER4 (FIG. 28D). Since the proliferation assay is done over a period of 5 days and the cell culture medium is not renewed daily, we believe that the biological impact of PTGER4 during leukemia cell proliferation is more noticeable when there is a reduced availability of nutrients in the extracellular environment.

PTGER4 has been implicated in the apoptotic response of many different cell types, but this response can be positive or negative depending on the cellular context (Babaev et al. 2008; Murn et al. 2008). Reh cells with a residual PTGER4 expression of 50% were more prone to enter apoptosis than their normal counterpart (Fig. 17D, shRNA PTGER4-C) or Reh cells with a residual PTGER4 expression of 25% (Fig. 17D, shRNA PTGER4-D). The apoptotic response was induced by a 4-hour treatment to camptothecin, but also in a basal growth medium. Reh cells with a decreased expression of PTGER4 were less viable than their normal counterpart under basal conditions (Fig. 17D, shRNA PTGER4-C and PTGER4-D), suggesting that PTGER4 is involved in leukemia cell survival. However, after a camptothecin treatment, only Reh cells with a residual PTGER4 expression of 50% (Fig 17D, shRNA PTGER4-C) were less viable, compared to their normal counterpart and Reh cells with a residual expression of 25% (Fig. 17D, shRNA PTGER4-D). Even though this might be due to an off-target effect, it is possible that the level of PTGER4 expression can tightly regulate the activation of

the DNA damage-induced apoptosis response in Reh cells and their viability. This could be explained by the rapid agonist-induced desensitization of the PTGER4 receptor compared to other PTGER receptors (Nishigaki et al. 1996).

Reh cells with a PTGER4 residual expression of 25% were impaired during migration through the CXCL12:CXCR4 (FIG. 17E). This effect was significant at CXCL12 1.0 nM (FIG. 17E). Similar to what we observed for SPHK1 and IL-18, the PTGER4 cell membrane receptor would facilitate the retention of pre-B leukemia cells into the bone marrow.

PGE₂ and the PTGER4 specific antagonist L-161982 decrease Reh cell proliferation.

The prostaglandin E₂ (PGE₂) is a natural ligand of PTGER4, whereas L-161982 is a specific antagonist to PTGER4 (Machwate et al. 2001). We assessed the role of PGE₂ and L-161982 during Reh cell proliferation over a period of 5 days. The PGE₂ natural ligand and the PTGER4 specific antagonist L-161982 were added at a concentration of 10 μM, according to previously published reports (Cherukuri et al. 2007; Doherty et al. 2009). PGE₂ and L-161982 were added either on the first day of the proliferation study or on a daily basis (FIG. 18).

When PGE₂ was added on the first day of the proliferation study, Reh cell proliferation was slower compared to the mock control (FIG. 18A). This negative effect of Reh cell proliferation was even more pronounced when PGE₂ was renewed on a daily basis (FIG. 18A). Therefore, the PGE₂ natural ligand is not responsible for the positive effect of PTGER4 expression during Reh cell proliferation. Interestingly, when we repeated the same experiment with the

PTGER4 specific antagonist L-161982, the proliferation rate of Reh cell was also compromised (FIG. 18B). These results show that the blockade of the PTGER4 receptor through a specific antagonist does reduce leukemia cell proliferation rate. This confirms that PTGER4 increases leukemia cell proliferation and survival. PGE₂ inhibits DNA synthesis in Reh cells according to previous reports (Naderi et al. 2005). Other PTGER receptors could explain this negative effect of PGE₂ on cell proliferation. In fact, pre-B leukemia lymphocytes express all members of the PTGER family (Malissein et al. 2006).

3.5. Discussion.

We identified four novel transcriptional targets of ETV6, a transcriptional repressor that is frequently inactivated in childhood pre-B ALL. Using a combination of chromatin immunoprecipitation and gene reporter assays, we showed that ETV6 represses the activity of *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM* promoters in a region close to the basal promoter. The interaction between ETV6 and the proximal promoters of *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM* indicated that these are direct transcriptional targets. Although differences in the expression of these four genes have been associated with many types of cancer (Cuvillier et al. 1996; Robertson et al. 2008; Doherty et al. 2009; Catalano et al. 2011), this is the first study which suggests that the modulation of their expression through ETV6 inactivation might have a role in leukemogenesis.

ETV6-mediated transcriptional repression of the novel targets

The molecular mechanisms used by ETV6 to regulate transcription involve its protein-protein interaction PNT domain and its DNA-binding domain ETS (Lopez et al. 1999). In this study, we have shown that the consensus EBS can indeed be involved in the transcriptional repression mediated by ETV6, but this molecular mechanism also depends on the regulated promoter and on the cell context. For example, the EBS-152 and EBS+277 located in the *LUM* basal promoter are essential to its ETV6-mediated transcription repression in Jurkat cells, but not in HeLa cells. Furthermore, the ETV6 transcriptional repression of the *SPHK1*, *IL-18* and *PTGER4* promoter does not rely exclusively on the presence and/or accessibility of consensus EBS. Altogether these findings suggest that the ETV6-

mediated transcriptional regulation might involve other DNA binding sites and/or the interaction with other proteins. It is known that ETV6 can interact with other Ets transcriptional activator like FLI-1 to repress its activity (Kwiatkowski et al. 1998). Other studies have shown that ETV6 can interact with histone acetyltransferases/HATS such as Tip60 (Nordentoft and Jorgensen 2003; Putnik et al. 2007) and proteins involved in the recruitment of histone deacetylases/HDAC such as Ncor, SMRT and mSin3a (Chakrabarti and Nucifora 1999; Guidez et al. 2000). Therefore, ETV6 could bind chromatin directly through a consensus EBS and/or another transcription factor. Also, we cannot rule out the possibility that ETV6 reaches its target promoter as a co-factor.

Leukemia cell proliferation and survival: SPHK1, IL-18 and PTGER4.

Previous studies have implicated ETV6 in the regulation of survival and apoptosis in different cell contexts: ETV6 is essential for hematopoietic stem cell survival (Hock et al. 2004); ETV6-knockout mice have excess apoptosis of mesenchymal and neural cells (Wang et al. 1997); ETV6 represses the expression of the antiapoptotic protein BCL-X_L and induces apoptosis (Irvin et al. 2003). Because ETV6 is inactivated in a substantial number of pre-B ALL patients carrying the t(12;21), we postulate that the modification of the expression of ETV6's targets such as *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM* could participate in the leukemogenesis process. In functional studies, we found that SPHK1 played a role in the activation of cell proliferation and during the inhibition of the DNA damage-induced apoptotic response in leukemia cells. SPHK1 is a lipid kinase that catalyses the phosphorylation of sphingosine to sphingosine-1-phosphate (S1P). Sphingosine

and S1P have opposite functions: sphingosine inhibits cell proliferation and stimulates apoptosis whereas S1P stimulates cell proliferation and inhibits apoptosis (Cuvillier et al. 1996).

The tumour micro-environment includes an array of components to facilitate the tumour proliferation and migration and their resistance to chemotherapy (Wu and Zhou 2009). These components include pro-inflammatory cytokine like IL-18. In pre-B leukemia cells, the expression of IL-18 could activate the DNA damage-induced apoptosis in a subtle manner. During the early steps of leukemogenesis, we can also speculate that the overabundance of IL-18 in the bone marrow microenvironment could eliminate the healthy hematopoietic cells and leave room to the proliferation and division of leukemia cells.

PTGER4 was favourable to leukemia cell proliferation, especially in an environment where the availability of nutrients gradually decreased since the culture cell medium was not renewed daily. PTGER4 was also important to limit the activation of the DNA damage-induced apoptosis. PTGER4 can increase the cellular proliferation in many cancer types including breast, colon and endometrial adenocarcinoma (Robertson et al. 2008; Doherty et al. 2009; Catalano et al. 2011). One study did propose that PTGER4 is a tumour suppressor gene in B cell receptor activated cells (Murn et al. 2008). This biological effect was achieved through the PGE₂/PTGER4 signalling pathway. In fact, we observed a slower leukemia cell proliferation in response to PGE₂, which was previously associated to an inhibition of DNA synthesis (Naderi et al. 2005). A similar effect was observed when leukemia cells were exposed to the a specific antagonist of PTGER4 named

L-161982. Therefore, the positive effect of PTGER4 during leukemia cell proliferation is not due to PGE₂, but most probably to another ligand.

Leukemia cell migration: SPHK1, IL-18 and PTGER4

SPHK1 can facilitate the migration of leukemia cells through the CXCL12/CXCR4 signalling pathway, which is required for the migration of haematopoietic stem cells (HSC) to the bone marrow during the development (Lapidot 2001). Sphingosine-1-phosphate is favourable to the invasion of haematopoietic murine cells toward stromal cells (Yanai et al. 2000). This effect was confirmed in human hematopoietic stem cells (Seitz et al. 2005). Furthermore, the transmembrane receptor S1P₁, recognized by S1P, has also been implicated in the CXCL12/CXCR4 signalling pathway. Specific inhibition of the CXCR4 activity, using the AMD 3100 antagonist, diminishes the hematopoietic stem cell mobilization in transgenic mice S1P₁^{-/-} (Juarez et al. 2011). Our study also confirms the role of SPHK1 in the leukemia cell migration through the CXCL12/CXCR4 signalling pathway.

IL-18 also facilitates the migration of leukemia cells through the CXCL12/CXCR4 pathway. A recent study has reported an up-regulation of IL-18, CXCR4 and CXCL12 during the migration of murine Lineage-Sca-1+c-Kit+ population from foetal to adult development (Ciriza and Garcia-Ojeda 2010). This cell population comprises different hematopoietic progenitors including HSC. Therefore, it is possible that the proinflammatory cytokine IL-18 modulates the homing of haematopoietic cells into the bone marrow.

According to our study, PTGER4 is also a positive regulator of leukemia cell migration through the CXCL12/CXCR4 pathway. To our knowledge, this is the first

study to suggest a role of PTGER4 in the homing process of haematopoietic cells. However, the role of PTGER4 in cell migration has been confirmed in other cell and/or physiological models. PTGER4 facilitates the migration of Langerhans cells during the skin immune response initiation (Kabashima et al. 2003). PTGER4 can also modulate the migration of lung tumour cells following PGE₂ activation (Kim et al. 2010). The implication of SPHK1, IL-18 and PTGER4 in the leukemia cell migration through the CXCL12/CXCR4 signalling pathway suggests that the ETV6 transcriptional targets could, in the context of childhood leukemia, favour the homing of leukemia cells in the bone marrow.

In conclusion, we identified four novel transcriptional targets of ETV6 that showed a deregulated expression in childhood pre-B ALL patients. According to the ETV6 expression status, SPHK1, IL-18 and PTGER4 can modulate the activity of many biological pathways involved in the initiation of pre-B ALL (FIG. 19). SPHK1, IL-18 and PTGER4 were positive regulated of leukemia cell proliferation and migration through the CXCL12/CXCR4 signalling pathway. These ETV6 transcriptional targets have the potential to increase the proliferation and expansion of pre-B leukemia cells into the bone marrow, which happens during the early step of the disease. This study provides evidence that the ETV6 transcriptional targets are involved in the development of childhood pre-B ALL.

3.6. Material and Method.

Cell culture

HeLa cells were maintained in DMEM medium (Wisent) supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent). Jurkat and Reh cells were maintained in RPMI-1640 medium (Wisent) supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent).

Constructs

To study the transcriptional regulation mediated by ETV6 on the promoters of *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM*, we targeted a region varying between 1 kb and 2 kb that comprised sequences both upstream and downstream of the first exon of the gene (transcription start site = position +1). Those promoters were amplified by PCR and subcloned upstream the Firefly luciferase gene of the pGL3-basic vector (Promega) using either endonuclease restriction sites or the Gateway technology (Invitrogen). The primers used are listed in table IX. The pro*SPHK1* -617/+115, pro*LUM* -584/+332 and -411/+332 were generated as follows : enzymatic digestion of pro*IL18* -1807/+185 with MluI/PvuII, pro*SPHK1* -858/+115 with SstI/PstI and SstI/ApaI, pro*LUM* -829/+332 with MluI/StuI and MluI/EcoRI, creation of blunted ends when necessary with the T4 DNA polymerase or Klenow (Invitrogen) and ligation with the T4 DNA ligase (Invitrogen) of the resulting vector according to the manufacturer's instructions. Full-length *ETV6* was subcloned in the MCS of the pcDNA3.1 vector (Invitrogen). Each construct was isolated through a bacterial transformation in a competent *Escherichia coli* DH5 α strain (Invitrogen) and the

integrity verified through direct sequencing of both strands with the ABI 3730 automatic sequencer.

The pLKO.1 constructs harboring the shRNA were purchased from Openbiosystem: shRNA SPHK1-A (TRCN0000036964), shRNA SPHK1-B (TRCN0000036966), shRNA PTGER4-C (TRCN000000207) and shRNA PTGER4-D (TRCN000000204). The shRNA and their scrambled counterpart sequences are presented in the table IX.

Site-directed mutagenesis

The mutation of the consensus EBS (GGAA→CCAA) in the promoters of *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM* were created using the QuickChange Multi-Site Directed Mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. The primers used are listed in table IX. The PNT and ETS domains of ETV6 were removed by inserting, respectively, a Pac1 or KpnI restriction site at each end of the domain of ETV6 subcloned in pcDNA3.1 (see above). This was done through directed mutagenesis using the primers listed in table IX. The functional domains were removed by enzymatic digestion with Pac1 for ETV6 Δ PNT and KpnI for ETV6 Δ ETS. The linear vectors were blunted when necessary with T4 DNA polymerase or Klenow (Invitrogen) and ligated with the T4 DNA ligase (Invitrogen). The constructs created through directed mutagenesis were transformed in *Escherichia coli* XL10-Gold ultracompetent cells (Stratagene). Direct sequencing with the ABI 3730 automatic sequencer was done on both DNA strands to verify the sequences/mutations for the mutated promoters and conservation of the initial open reading frame for ETV6 Δ PNT and ETV6 Δ ETS.

Transient transfections

Cells (5×10^4 HeLa cells, 1×10^5 Jurkat cells) were transfected in a white 96-well plate using lipofectamineTM 2000 (Invitrogen) and a combination of constructs: pGL3-basic vector with promoter (99.5 ng HeLa cells, 60 ng Jurkat cells) (Promega), pcDNA3.1 vector with ETV6 cDNA (40 ng in both HeLa and Jurkat cells) (Invitrogen) and pRL-CMV vector (0.5 ng HeLa cells, 40 ng Jurkat cells) (Promega) to normalize transfection efficiency. Total DNA transfected was 200 ng for HeLa cells and 240 ng for Jurkat cells and, when applicable, was adjusted with the empty pcDNA3.1 vector. Leucoagglutinin (PHA-L; final concentration 1 μ g/mL) and phorbol myristyl acetate (PMA; final concentration 50 ng/mL) were added to each reaction 4 hours after transfection in Jurkat cells.

Luciferase-reporter assays

48-hours after transfection, the Jurkat cells were transferred in a treated poly-D-lysine plate (Sigma) and harvested with 40 μ L of Passive Lysis Buffer 1X (Promega) by rock/shaking at room temperature for 30 min. HeLa cells were directly harvested with 30 μ L of Passive Lysis Buffer 1X. Luciferase activity was measured with the LARII and Stop & Glo (Promega) reagents according to the manufacturer's instruction and measured with the LLMAX³⁸⁴ LUMinometer (Molecular Devices). The relative luciferase activity (firefly luciferase activity/renilla firefly activity) was used to measure the transcriptional repression exerted by ETV6, ETV6 Δ PNT and ETV6 Δ ETS on the promoters under investigation.

Chromatin immunoprecipitation assays

The chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay was done as follows. 20×10^6 HeLa cells inducible for *ETV6*-HA (Boily et al. 2007) were induced for 48 hours with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxycycline, cross-linked with 1% formaldehyde for 10 minutes at room temperature, glycine stopped, rinsed with 1x PBS and harvested. The resultant cell pellet was lysed and sonicated to obtain 200 to 1500 bp fragments. After one round of immunoprecipitation with anti-HA antibody (HA probe F-7: SC7392; Santa Cruz Biotechnology), the precipitates were reverse cross-linked and treated with proteinase K. The purified DNA was analysed by quantitative real-time PCR analysis with primers that detect specific sequences of upstream genomic regions of the four genes of interest. The primers used are listed in table IX.

Lentiviral transduction

Lentivirus used for the functional studies were produced as previously described (Naldini et al. 1996). The titer of the lentivirus was measured by multiplicity of infection / M.O.I and by p24 ELISA according to the manufacturer's instructions (Perkin Elmer NEK050). 1×10^6 Reh cells were infected at a multiplicity of infection of 1 in the presence of 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of polybrene (Sigma-Aldrich 107689). 48 hours later, a puromycin (Sigma-Aldrich P8893) selection at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ was initiated to enrich the transduced cells.

Quantitative PCR, immunoblot and ELISA

For quantitative PCR of mRNA, we used the same primers and protocol as described previously (Boily et al. 2007). For Western blots, total proteins were

extracted from $10\text{-}20 \times 10^6$ Reh cells using the RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulphate and 50 mM pH 8.0 Tris) supplemented with complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche, 11873580001). Cell pellets were resuspended in RIPA buffer and incubated at 4°C for 30 minutes, followed by Lowry protein quantification according to the manufacturer's instructions (BioRad, 500-0116). Protein denaturation was carried at 95°C during 5 minutes in Laemmli Buffer 1X (2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.002% bromophenol blue and 0.075 M Tris-HCl). Proteins migrated through SDS-PAGE and were transferred to a nitrocellulose membrane overnight at 4°C. Membranes were soaked for one hour at room temperature in the blocking buffer (5% skimmed milk, 0.05% Tween 20™, diluted in Tris buffer saline), followed by hybridization with primary antibodies for one hour at room temperature using SPHK1 mouse monoclonal antibody (AbCam ab-56414, 0.5 µg/mL) mouse monoclonal IL18 (Santa Cruz sc-13602, 0.4 µg/mL), mouse monoclonal PTGER4 (Santa Cruz sc-55596, 0.4 µg/mL) and goat polyclonal GAPDH (Santa Cruz sc-31915, 0.4 µg/mL) diluted 200-1000 times in the blocking buffer. Hybridization with the secondary antibody coupled to the horseradish peroxidase, diluted 5000 times in the blocking buffer, was done for one hour at room temperature (Mouse IgG Santa Cruz sc-166574 or Goat IgG Santa Cruz sc-48167, 0.04 µg/mL). Protein bands were detected using enhanced chemiluminescence according to the manufacturer's instructions (Pierce 32106) followed by autoradiography. For the human IL-18 ELISA, we used the supernatant of Reh cells according to the manufacturer's instructions (MBL International Corporation 7620).

Cell proliferation and survival assays

In a 6-well plate, Reh cells were seeded at a density of 0.4×10^5 ϕ /mL in RPMI 1640 FBS 10%. The cell density was measured daily using the Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, 11644807001), according to the manufacturer's instructions. The absorbance of the formazan dye was measured at a wavelength of 450 nm (reference wavelength = 750 nm) and is proportional to the cell density.

DNA damage-induced apoptosis

Apoptosis assays were carried out using the FITC AnnexinV/Dead Cell apoptosis kit (Invitrogen, V13242), according to the manufacturer's instructions. Cells were seeded at 4×10^5 ϕ /mL in RPMI 1640 FBS 10%. The DNA damage-induced apoptosis was induced with a 4-hour treatment to camptothecin of 2 μ M (Tocris Bioscience, 1100). Stained cells were analyzed using BD Biosciences FACS Aria and the BD FACSDiva software.

Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was carried out with the FITC BrdU Flow Kit (BD Pharmigen, 559619), according to the manufacturer's instructions. Cells were synchronized with a 24 hour serum-starvation in RPMI 1640 FBS 0.5%, and then transferred to RPMI 1640 FBS 10% medium for 24 hours. Stained cells were analyzed using BD Biosciences FACS Aria and the BD FACSDiva software.

Transmigration assay

Reh cells were suspended in RPMI 1640 FBS 10% at a density of 8×10^6 ϕ /mL, of which 25 μ L were placed in the upper-chamber of a ChemoTx[®] 3.2 mm diameter 96 well-plate (NeuroProbe). The CXCL12 chemokine (ProSpec, CHM-262) was placed in the lower-chamber and diluted in RPMI 1640 FBS 10% (ProSpec, CHM-262). Migration was carried at 37°C, 5% CO₂ for 2-hours. The cell density in the lower chamber represented the output of the experiment and was measured using the Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, 11644807001). The Reh cell stock at 8×10^6 ϕ /mL was the input and served as the reference to measure the relative cell migration.

Statistical analysis

The differences between the promoters activity of the various constructs was measured with a non parametric Mann-Whitney t test or a One-way ANOVA test with a Dunn's multiple comparison test or a Two-way ANOVA with a bonferroni post test. Cell proliferation analysis was done using a linear regression to compare the significant differences between the slopes and intercepts. Apoptosis and cell cycle data were compared using an unpaired t test. Transmigration assays were compared using a non parametric Mann-Whitney t test. For all experiments, the significant two-sided p-value cut-off was 0.05. The graph and statistical analysis were carried out using GraphPad 5.0 software.

3.7. Conflicts of interest.

The authors have no potential conflicts of interest and no competing financial interests.

C.M. designed and performed the gene reporter assays experiments as well as all the functional studies, analyzed the results and wrote the manuscript. S.L. performed the chromatin immunoprecipitation experiments. J.L. participated to the design of the experiments, E.K. revised the manuscript, D.S. is the principal investigator of the research and participated in the design and interpretation of the results as well as in the writing of the paper.

3.8. Acknowledgements.

The authors wish to thank Caroline Meloche and Gabrielle Marcoux-Houde for their initial implication in the project, Patrick Beaulieu for his help using the Transfac tool and Ekat Kritikou for her precious feedback. C.M. has a Ph.D. scholarship from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). D.S. holds the François-Karl Viau Chair in Pediatric Oncogenomics and is a scholar of the FRSQ.

3.9. References.

- Anderson K, Lutz C, van Delft FW, Bateman CM, Guo Y, Colman SM, Kempinski H, Moorman AV, Tittley I, Swansbury J et al. 2011. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* **469**: 356-361.
- Andreasson P, Schwaller J, Anastasiadou E, Aster J, Gilliland DG. 2001. The expression of ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) is not sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines in vitro or the induction of hematologic disease in vivo. *Cancer Genet Cytogenet* **130**: 93-104.
- Babaev VR, Chew JD, Ding L, Davis S, Breyer MD, Breyer RM, Oates JA, Fazio S, Linton MF. 2008. Macrophage EP4 deficiency increases apoptosis and suppresses early atherosclerosis. *Cell Metab* **8**: 492-501
- Bohlander SK. 2005. ETV6: a versatile player in leukemogenesis. *Semin Cancer Biol* **15**: 162-174.
- Boily G, Larose J, Langlois S, Sinnett D. 2007. Identification of transcripts modulated by ETV6 expression. *Br J Haematol* **136**: 48-62.
- Catalano RD, Wilson MR, Boddy SC, McKinlay AT, Sales KJ, Jabbour HN. 2011. Hypoxia and prostaglandin E receptor 4 signalling pathways synergise to promote endometrial adenocarcinoma cell proliferation and tumour growth. *PLoS One* **6**: e19209.
- Chakrabarti SR, Nucifora G. 1999. The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. *Biochem Biophys Res Commun* **264**: 871-877.
- Cherukuri DP, Chen XB, Goulet AC, Young RN, Han Y, Heimark RL, Regan JW, Meuillet E, Nelson MA. 2007. The EP4 receptor antagonist, L-161,982, blocks prostaglandin E2-induced signal transduction and cell proliferation in HCA-7 colon cancer cells. *Exp Cell Res* **313**: 2969-2979.
- Ciriza J, Garcia-Ojeda ME. 2010. Expression of migration-related genes is progressively upregulated in murine Lineage-Sca-1+c-Kit+ population from the fetal to adult stages of development. *Stem Cell Res Ther* **1**: 14.
- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, Spiegel S. 1996. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* **381**: 800-803.
- Doherty GA, Byrne SM, Molloy ES, Malhotra V, Austin SC, Kay EW, Murray FE, Fitzgerald DJ. 2009. Proneoplastic effects of PGE2 mediated by EP4 receptor in colorectal cancer. *BMC Cancer* **9**: 207.
- Fears S, Gavin M, Zhang DE, Hetherington C, Ben-David Y, Rowley JD, Nucifora G. 1997. Functional characterization of ETV6 and ETV6/CBFA2 in the regulation of the MCSFR proximal promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 1949-1954.
- Fenrick R, Wang L, Nip J, Amann JM, Rooney RJ, Walker-Daniels J, Crawford HC, Hulboy DL, Kinch MS, Matrisian LM et al. 2000. TEL, a putative tumor suppressor, modulates cell growth and cell morphology of ras-transformed cells while repressing the transcription of stromelysin-1. *Mol Cell Biol* **20**: 5828-5839.
- Ferrando AA, Look AT. 2000. Clinical implications of recurring chromosomal and associated molecular abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* **37**: 381-395.
- Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MC, Van Wering ER, Greaves M. 1998. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4584-4588.
- Greaves M, Janossy G. 1978. Patterns of gene expression and the cellular origins of human leukaemias. *Biochim Biophys Acta* **516**: 193-230

- Guidez F, Petrie K, Ford AM, Lu H, Bennett CA, MacGregor A, Hannemann J, Ito Y, Ghysdael J, Greaves M et al. 2000. Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. *Blood* **96**: 2557-2561.
- Hock H, Meade E, Medeiros S, Schindler JW, Valk PJ, Fujiwara Y, Orkin SH. 2004. Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev* **18**: 2336-2341.
- Hong D, Gupta R, Ancliff P, Atzberger A, Brown J, Soneji S, Green J, Colman S, Piacibello W, Buckle V et al. 2008. Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science* **319**: 336-339.
- Irvin BJ, Wood LD, Wang L, Fenrick R, Sansam CG, Packham G, Kinch M, Yang E, Hiebert SW. 2003. TEL, a putative tumor suppressor, induces apoptosis and represses transcription of Bcl-XL. *J Biol Chem* **278**: 46378-46386.
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. 2010. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* **60**: 277-300.
- Juarez JG, Harun N, Thien M, Welschinger R, Baraz R, Dela Pena A, Pitson SM, Rettig M, Dipersio JF, Bradstock KF et al. 2011. Sphingosine-1-phosphate facilitates trafficking of hematopoietic stem cells and their mobilization by CXCR4 antagonists in mice. *Blood*.
- Kabashima K, Sakata D, Nagamachi M, Miyachi Y, Inaba K, Narumiya S. 2003. Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nat Med* **9**: 744-749.
- Kim JI, Lakshmikanthan V, Frilot N, Daaka Y. 2010. Prostaglandin E2 promotes lung cancer cell migration via EP4-betaArrestin1-c-Src signalsome. *Mol Cancer Res* **8**: 569-577.
- Kitaura H, Tatamiya M, Nagata N, Fujimura Y, Eguchi T, Yoshida N, Nakayama K. 2006. IL-18 induces apoptosis of adherent bone marrow cells in TNF-alpha mediated osteoclast formation in synergy with IL-12. *Immunol Lett* **107**: 22-31.
- Kuwata T, Gongora C, Kanno Y, Sakaguchi K, Tamura T, Kanno T, Basrur V, Martinez R, Appella E, Golub T et al. 2002. Gamma interferon triggers interaction between ICSPB (IRF-8) and TEL, recruiting the histone deacetylase HDAC3 to the interferon-responsive element. *Mol Cell Biol* **22**: 7439-7448.
- Kwiatkowski BA, Bastian LS, Bauer TR, Jr., Tsai S, Zielinska-Kwiatkowska AG, Hickstein DD. 1998. The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem* **273**: 17525-17530.
- Kwiatkowski BA, Zielinska-Kwiatkowska AG, Bauer TR, Jr., Hickstein DD. 2000. The ETS family member Tel antagonizes the Fli-1 phenotype in hematopoietic cells. *Blood Cells Mol Dis* **26**: 84-90.
- Landry JR, Kinston S, Knezevic K, Donaldson IJ, Green AR, Gottgens B. 2005. Fli1, Elf1, and Ets1 regulate the proximal promoter of the LMO2 gene in endothelial cells. *Blood* **106**: 2680-2687.
- Lapidot T. 2001. Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions. *Ann N Y Acad Sci* **938**: 83-95.
- Lilljebjorn H, Sonesson C, Andersson A, Heldrup J, Behrendtz M, Kawamata N, Ogawa S, Koeffler HP, Mitelman F, Johansson B et al. 2010. The correlation pattern of acquired copy number changes in 164 ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemias. *Hum Mol Genet* **19**: 3150-3158.
- Linabery AM, Ross JA. 2008. Trends in childhood cancer incidence in the U.S. (1992-2004). *Cancer* **112**: 416-432.
- Lopez RG, Carron C, Oury C, Gardellin P, Bernard O, Ghysdael J. 1999. TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem* **274**: 30132-30138.

- Machwate M, Harada S, Leu CT, Seedor G, Labelle M, Gallant M, Hutchins S, Lachance N, Sawyer N, Slipetz D et al. 2001. Prostaglandin receptor EP(4) mediates the bone anabolic effects of PGE(2). *Mol Pharmacol* **60**: 36-41.
- Malissein E, Reynaud S, Bordessoule D, Faucher JL, Turlure P, Trimoreau F, Denizot Y. 2006. PGE(2) receptor subtype functionality on immature forms of human leukemic blasts. *Leuk Res* **30** : 1309-1313
- Matys V, Kel-Margoulis OV, Fricke E, Liebich I, Land S, Barre-Dirrie A, Reuter I, Chekmenev D, Krull M, Hornischer K et al. 2006. TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **34**: D108-110.
- Montpetit A, Boily G, Sinnett D. 2002. A detailed transcriptional map of the chromosome 12p12 tumour suppressor locus. *Eur J Hum Genet* **10**: 62-71.
- Montpetit A, Larose J, Boily G, Langlois S, Trudel N, Sinnett D. 2004. Mutational and expression analysis of the chromosome 12p candidate tumor suppressor genes in pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **18**: 1499-1504.
- Morrow M, Horton S, Kioussis D, Brady HJ, Williams O. 2004. TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity. *Blood* **103**: 3890-3896.
- Murn J, Alibert O, Wu N, Tendil S, Gidrol X. 2008. Prostaglandin E2 regulates B cell proliferation through a candidate tumor suppressor, Ptger4. *J Exp Med* **205**: 3091-3103.
- Naderi S, Wang JY, Chen TT, Gutzkow KB, Blomhoff HK. 2005. cAMP-mediated inhibition of DNA replication and S phase progression: involvement of Rb, p21Cip1, and PCNA. *Mol Biol Cell* **16**: 1527-1542.
- Nakamura S, Otani T, Okura R, Ijiri Y, Motoda R, Kurimoto M, Orita K. 2000. Expression and responsiveness of human interleukin-18 receptor (IL-18R) on hematopoietic cell lines. *Leukemia* **14**:1052-1059.
- Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**: 263-267.
- Nishigaki N, Negishi M, Ichikawa A. 1996. Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP2 and EP4, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. *Mol Pharmacol* **50**:1031-1037.
- Nordentoft I, Jorgensen P. 2003. The acetyltransferase 60 kDa trans-acting regulatory protein of HIV type 1-interacting protein (Tip60) interacts with the translocation E26 transforming-specific leukaemia gene (TEL) and functions as a transcriptional co-repressor. *Biochem J* **374**: 165-173.
- O'Neil J, Look AT. 2007. Mechanisms of transcription factor deregulation in lymphoid cell transformation. *Oncogene* **26**: 6838-6849.
- Patel N, Goff LK, Clark T, Ford AM, Foot N, Lillington D, Hing S, Pritchard-Jones K, Jones LK, Saha V. 2003. Expression profile of wild-type ETV6 in childhood acute leukaemia. *Br J Haematol* **122**: 94-98.
- Poirel H, Oury C, Carron C, Duprez E, Laabi Y, Tsapis A, Romana SP, Mauchauffe M, Le Coniat M, Berger R et al. 1997. The TEL gene products: nuclear phosphoproteins with DNA binding properties. *Oncogene* **14**: 349-357.
- Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. 2011. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* **29**: 551-565.
- Putnik J, Zhang CD, Archangelo LF, Tizazu B, Bartels S, Kickstein M, Greif PA, Bohlander SK. 2007. The interaction of ETV6 (TEL) and TIP60 requires a functional histone acetyltransferase domain in TIP60. *Biochim Biophys Acta* **1772**: 1211-1224.
- Rabbitts TH. 1991. Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias. *Cell* **67**: 641-644.

- Robertson FM, Simeone AM, Mazumdar A, Shah AH, McMurray JS, Ghosh S, Cristofanilli M. 2008. Molecular and pharmacological blockade of the EP4 receptor selectively inhibits both proliferation and invasion of human inflammatory breast cancer cells. *J Exp Ther Oncol* **7**: 299-312.
- Sabaawy HE, Azuma M, Embree LJ, Tsai HJ, Starost MF, Hickstein DD. 2006. TEL-AML1 transgenic zebrafish model of precursor B cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 15166-15171.
- Seitz G, Boehmler AM, Kanz L, Mohle R. 2005. The role of sphingosine 1-phosphate receptors in the trafficking of hematopoietic progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci* **1044**: 84-89.
- Starck J, Doubeikovski A, Sarrazin S, Gonnet C, Rao G, Skoultchi A, Godet J, Dusanter-Fourt I, Morle F. 1999. Spi-1/PU.1 is a positive regulator of the Fli-1 gene involved in inhibition of erythroid differentiation in friend erythroleukemic cell lines. *Mol Cell Biol* **19**: 121-135.
- Tomura M, Zhou XY, Maruo S, Ahn HJ, Hamaoka T, Okamura H, Nakanishi K, Tanimoto T, Kurimoto M, Fujiwara H. 1998. A critical role for IL-18 in the proliferation and activation of NK1.1+ CD3- cells. *J Immunol* **160**: 4738-4746.
- Tsuzuki S, Karnan S, Horibe K, Matsumoto K, Kato K, Inukai T, Goi K, Sugita K, Nakazawa S, Kasugai Y, Ueda R, Seto, M. 2007. Genetic abnormalities involved in t(12;21) TEL-AML1 acute lymphoblastic leukemia: analysis by means of array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci* **98**: 698-706
- Tsuzuki S, Seto M, Greaves M, Enver T. 2004. Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 8443-8448.
- van der Weyden L, Giotopoulos G, Rust AG, Matheson LS, van Delft FW, Kong J, Corcoran AE, Greaves MF, Mullighan CG, Huntly BJ et al. 2011. Modeling the evolution of ETV6-RUNX1-induced B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in mice. *Blood*.
- Wang LC, Kuo F, Fujiwara Y, Gilliland DG, Golub TR, Orkin SH. 1997. Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *EMBO J* **16**: 4374-4383.
- Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, Davidson L, Visvader J, Kuo F, Alt FW, Gilliland DG, Golub TR, Orkin SH. 1998. The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* **12**: 2392-2402.
- Yanai N, Matsui N, Furusawa T, Okubo T, Obinata M. 2000. Sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid trigger invasion of primitive hematopoietic cells into stromal cell layers. *Blood* **96**: 139-144.
- Zuna J, Ford AM, Peham M, Patel N, Saha V, Eckert C, Kochling J, Panzer-Grumayer R, Trka J, Greaves M. 2004. TEL deletion analysis supports a novel view of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* **10**: 5355-5360.

3.10. Figure legends.

Figure 13. ETV6 binds the proximal promoters of *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM*.

(A) Schematic diagrams depicting the promoter regions of *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM* that were used for gene reporter assays and chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments. The transcription start site (TSS) corresponds to the position +1. EBS were predicted by TRANSFAC and are indicated by black vertical lines. (B) Chromatin immunoprecipitation against a pre-immune serum (white bar) and against ETV6-HA (black bar) in HeLa cells. The chromatin enrichment is depicted as the percentage of input on the y axis (% input). Data are depicted as mean \pm standard error (n = 2). Statistical differences were measured using a Kruskal-Wallis One-Way ANOVA with a Dunn's multiple comparison test. Two-sided p-values are depicted: p > 0.05 (NS), p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), and p < 0.001 (***)

Figure 14. ETV6 regulates transcription through its PNT and ETS functional domains.

(A) The wild-type coding sequence of ETV6 and its truncated versions (ETV6 Δ PNT and ETV6 Δ ETS) were subcloned into the expression vector pcDNA3.1. Gene reporter assays in (B) HeLa cells and (C) Jurkat cells. "Basis" the promoterless pGL3-basic vector, "3EBStk" is the positive control for the transcriptional repression mediated by ETV6. The pGL3basic vector with the promoter constructs *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM* (Firefly luciferase), the pRL-

CMV internal control (Renilla luciferase) and the ETV6 construct (pcDNA3.1) were co-transfected in HeLa and Jurkat cells. The relative luciferase activity (RLA, ratio between the Firefly and Renilla luciferase activities) represents is proportional to the promoter's activities. Data are presented as boxplot (whiskers: min to max) and are compared using a Kruskal-Wallis One-Way ANOVA with a Dunn's multiple comparison test ($n = 3$). Two-sided p-values are depicted: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***).

Figure 15. SPHK1 is a positive regulator of leukemia cell survival and migration.

(A) SPHK1 expression level was measured by quantitative PCR. Reh cells expressing the shRNA SPHK1-A or SPHK1-B showed a residual SPHK1 expression of 63% at the mRNA level. (B) Western blot of the total protein extract of Reh cells expressing the scrambled shRNA, the shRNAs SPHK1-A and SPHK1-B. The residual SPHK1 protein levels are indicated. (C) Proliferation assay of Reh cells expressing the scrambled shRNA, the shRNAs SPHK1-A or SPHK1-B. The formazan dye absorbance was measured at a wavelength of 450 nm. A linear regression from day 0 to day 5 assessed the statistical differences between the slopes (*) and the intercepts (Δ), using scrambled shRNA as a reference ($n = 4$). (D) DNA damage-induced apoptosis of Reh cells expressing the scrambled shRNA, the shRNAs SPHK1-A or SPHK1-B. A 4-hour treatment to camptothecin was used to induce apoptosis, followed by a double-staining with AnnexinV-FITC and PI to identify the three main cell populations: Necrosis (AnnexinV+/PI+), Apoptosis (AnnexinV+/PI-) and Viable (AnnexinV-/PI-). The cell population

distribution corresponds to the % of the parent cell population and is depicted on the y axis. Data are presented at the mean \pm SEM (n = 3). An unpaired t test was used to measure the statistical differences. (E) Transmigration assay of Reh cells expressing the scrambled shRNA, the shRNAs SPHK1-A or SPHK1-B toward the CXCL12 chemokine at various concentrations (0.01-0.1-1-10-100 nM). Relative cell migration is depicted on the y axis (output of cells after migration/input). Data are presented as mean \pm SEM (n = 4). Statistical differences were measured using a non-parametric Mann-Whitney t test (n = 4). Two-sided p-values are indicated: p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), and p < 0.001 (***).

Figure 16. IL-18 affects Reh cell migration through the CXCL12/CXCR4 pathway.

(A) Quantitative PCR of IL-18 mRNA of Reh cells expressing the pLenti or pLenti-IL-18. (B) Western blot of the total protein extract of Reh cells expressing the pLenti or pLenti-IL-18. (C) Quantification of IL-18 mature protein in the extracellular environment of Reh cells expressing pLenti or pLenti-IL-18, using an ELISA. (D) Proliferation assay of Reh cells expressing the pLenti or pLenti-IL-18. The formazan absorbance was measured at a wavelength of 450 nm. A linear regression from day 0 to day 5 assessed the statistical differences between the slopes (*) and the intercepts (Δ), using Reh pLenti cells as a reference (n = 4). (E) DNA damage-induced apoptosis of Reh cells (pLenti and pLenti-IL18). A 4-hour treatment to camptothecin was used to induce apoptosis, followed by a double-staining with AnnexinV-FITC and PI to identify the three main cell populations: Necrosis (AnnexinV+/PI+), Apoptosis (AnnexinV+/PI-) and Viable (AnnexinV-/PI-).

The cell population distribution corresponds to the % of the parent cell population and is depicted on the y axis. Data are presented at the mean \pm SEM (n = 3). An unpaired t test was used to measure the statistical differences. (E) Transmigration assay of Reh cells expressing the pLenti or pLenti-IL-18 toward the CXCL12 chemokine at various concentrations (0.01-0.1-1-10-100 nM). Relative cell migration is depicted on the y axis (output of cells after migration/input). Data are presented as mean \pm SEM (n = 4). Statistical differences were measured using a non-parametric Mann-Whitney t test (n = 4). Two-sided p-values are indicated: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***).

Figure 17. PTGER4 is involved during leukemia cell proliferation and migration through the CXCL12/CXCR4 pathway.

(A) Quantitative PCR was used to measure the PTGER4 mRNA level in Reh cells expressing the scrambled shRNA, the shRNAs PTGER4-C and PTGER4-D. (B) Western blot of the total protein extract of Reh cells expressing the scrambled shRNA, the shRNAs PTGER4-C and PTGER4-D. The residual SPHK1 protein levels are indicated. (C) Proliferation assay of Reh cells expressing the scrambled shRNA, the shRNAs PTGER4-C or PTGER4-D. The formazan dye absorbance was measured at a wavelength of 450 nm. A linear regression analysis was used to assess the statistical difference between the slopes (*) and between the intercepts (Δ), using Reh cells expressing the scrambled shRNA as a reference (n = 4). (D) DNA damage-induced apoptosis of Reh cells expressing the scrambled shRNA, the shRNAs PTGER4-C or PTGER4-D. A 4-hour treatment to camptothecin was used to induce apoptosis, followed by a double-staining with

AnnexinV-FITC and PI to identify the three main cell populations: Necrosis (AnnexinV+/PI+), Apoptosis (AnnexinV+/PI-) and Viable (AnnexinV-/PI-). The cell population distribution corresponds to the % of the parent cell population and is depicted on the y axis. Data are presented at the mean \pm SEM (n = 3). An unpaired t test was used to measure the statistical differences. (F) Transmigration assay of Reh cells expressing the scrambled shRNA or the shRNA PTGER4-C or PTGER4-D toward the CXCL12 chemokine at various concentrations (0.01-0.1-1-10-100 nM). Relative cell migration is depicted on the y axis (output of cells after migration/input). Data are presented as mean \pm SEM (n = 4). Statistical differences were measured using a non-parametric Mann-Whitney t test (n = 4). Two-sided p-values are indicated: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***)

Figure 18. PGE₂ and the PTGER4 antagonist L-161982 both decelerate leukemia cell proliferation.

(A) Proliferation assay of Reh cells. Mock or PGE₂ 10 μ M was added on the first day or daily, as indicated. (B) Proliferation assay of Reh cells. Mock or the PTGER4 antagonist L-161982 10 μ M was added on the first day or daily, as indicated. The formazan dye absorbance was measured at a wavelength of 450 nm. A linear regression analysis was used to assess the statistical difference between the slopes (*) and between the intercepts (Δ), using mock as a reference. Data are presented as mean \pm SEM (n = 3). Two-sided p-values are indicated: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***)

Figure 19. SPHK1, IL-18 and PTGER4 are involved in childhood pre-B ALL.

Proposed model for the role of the ETV6 transcriptional targets during childhood leukemogenesis. The inactivation of ETV6 leads to an increased expression of its transcriptional targets like SPHK1, IL-18 and PTGER4. This can modulate biological pathways to facilitate the proliferation and expansion of leukemia cells like cell proliferation, DNA damage-induced apoptosis and migration through the CXCL12/CXCR4 signalling pathway.

Figure 20. SPHK1 is a transcriptional target of ETV6.

Luciferase reporter assay of different promoter constructs containing *SPHK1* promoters in (A) HeLa cells and (B) Jurkat cells. “Basic” is the promoterless pGL3b vector and “3EBS_{tk}” corresponds to a sequence of three tandem EBS located upstream of a minimal thymidine kinase promoter and the promoters studied are depicted in figure 13 (Firefly luciferase). The wild type form of ETV6 was co-transfected in the cells along with an internal control to normalize for the promoter activities (Renilla luciferase). The relative luciferase activity (RLA) represented the ratio between the Firefly and Renilla luciferase activities. Data are presented as boxplot (whiskers: min to max) and compared using a non-parametric Mann-Whitney t test. Two-sided p-values are depicted: $p < 0.05$ (*).

Figure 21. IL-18 is a transcriptional target of ETV6.

Luciferase reporter assay of different promoter constructs containing *IL-18* promoter in (A) HeLa cells and (B) Jurkat cells. “Basic” is the promoterless pGL3b vector and “3EBS_{tk}” corresponds to a sequence of three tandem EBS located

upstream of a minimal thymidine kinase promoter and the promoters studied are depicted in figure 13 (Firefly luciferase). The wild type form of ETV6 was co-transfected in the cells along with an internal control to normalize for the promoter activities (Renilla luciferase). The relative luciferase activity (RLA) represented the ratio between the Firefly and Renilla luciferase activities. Data are presented as boxplot (whiskers: min to max) and compared using a non-parametric Mann-Whitney t test. Two-sided p-values are depicted: $p < 0.05$ (*).

Figure 22. *PTGER4* is a transcriptional target of ETV6.

Luciferase reporter assay of different promoter constructs containing *PTGER4* promoter in (A) HeLa cells and (B) Jurkat cells. “Basic” is the promoterless pGL3b vector and “3EBStk” corresponds to a sequence of three tandem EBS located upstream of a minimal thymidine kinase promoter and the promoters studied are depicted in figure 13 (Firefly luciferase). The wild type form of ETV6 was co-transfected in the cells along with an internal control to normalize for the promoter activities (Renilla luciferase). The relative luciferase activity (RLA) represented the ratio between the Firefly and Renilla luciferase activities. Data are presented as boxplot (whiskers: min to max) and compared using a non-parametric Mann-Whitney t test. Two-sided p-values are depicted: $p < 0.05$ (*).

Figure 23. *LUM* is a transcriptional target of ETV6.

Luciferase reporter assay of different promoter constructs containing *LUM* promoter in (A) HeLa cells and (B) Jurkat cells. “Basic” is the promoterless pGL3b vector and “3EBStk” corresponds to a sequence of three tandem EBS located

upstream of a minimal thymidine kinase promoter and the promoters studied are depicted in figure 13 (Firefly luciferase). The wild type form of ETV6 was co-transfected in the cells along with an internal control to normalize for the promoter activities (Renilla luciferase). The relative luciferase activity (RLA) represented the ratio between the Firefly and Renilla luciferase activities. Data are presented as boxplot (whiskers: min to max) and compared using a non-parametric Mann-Whitney t test. Two-sided p-values are depicted: $p < 0.05$ (*).

Figure 24. Ets-Binding Sites are implicated in the ETV6-mediated transcriptional repression of the *SPHK1* promoter in HeLa cells.

Luciferase reporter assay of the *SPHK1* basal promoter with intact EBS (pGL3b proSPHK1 -168/+115) and with mutated EBS (mEBS-158, mEBS-104, mEBS-84, mEBS+60). Experiments were carried out in (A) HeLa and (B) Jurkat cells. Consensus EBS are indicated in Table VIII. Wild type and truncated versions of ETV6 were co-transfected in the cells along with the promoter constructs (Firefly luciferase) and the pRL-CMV internal control (Renilla luciferase). The relative luciferase activity (RLA) represents the ratio between the Firefly and Renilla luciferase activities. Data are presented as boxplot (whiskers: min to max) and compared using a One-Way ANOVA Kruskal-Wallis test combined with Dunn's multiple comparison test ($n = 3$). Two-sided p-values are indicated: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***).

Figure 25. Ets-Binding Sites are implicated in the ETV6-mediated transcriptional repression of the *IL-18* promoter in HeLa cells.

Luciferase reporter assay of the *IL-18* basal promoter with intact EBS (pGL3b pro*IL18* -174/+79) and with mutated EBS (mEBS-157, mEBS-79, mEBS-3, mEBS-157 -79 -3 and mEBS+61). Experiments were carried out in (A) HeLa and (B) Jurkat cells. Consensus EBS are indicated in Table VIII. Wild type and truncated versions of ETV6 were co-transfected in the cells along with the promoter constructs (Firefly luciferase) and the pRL-CMV internal control (Renilla luciferase). The relative luciferase activity (RLA) represents the ratio between the Firefly and Renilla luciferase activities. Data are presented as boxplot (whiskers: min to max) and compared using a One-Way ANOVA Kruskal-Wallis test combined with Dunn's multiple comparison test (n = 3). Bilateral p-values are indicated: p<0.05 (*), p<0.01 (**) and p<0.001 (***).

Figure 26. Ets-Binding Sites are implicated in the ETV6-mediated transcriptional repression of the *PTGER4* promoter in HeLa cells.

Luciferase reporter assay of the *PTGER4* basal promoter with intact EBS (pGL3b pro*PTGER4* -337/+178) and with mutated EBS (mEBS-305, mEBS-97 -92, mEBS-55 -49 and mEBS+35). Experiments were carried out in (A) HeLa and (B) Jurkat cells. Consensus EBS are indicated in Table VIII. Wild type and truncated versions of ETV6 were co-transfected in the cells along with the promoter constructs (Firefly luciferase) and the pRL-CMV internal control (Renilla luciferase). The relative luciferase activity (RLA) represents the ratio between the Firefly and Renilla luciferase activities. Data are presented as boxplot (whiskers: min to max) and compared using a One-Way ANOVA Kruskal-Wallis test combined with Dunn's

multiple comparison test ($n = 3$). Two-sided p-values are indicated: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***)).

Figure 27. Ets-Binding Sites are implicated in the ETV6-mediated transcriptional repression of the *LUM* promoter in Jurkat cells.

Luciferase reporter assay of the *LUM* basal promoter with intact EBS (pGL3b proLUM -411/+332) and with mutated EBS (mEBS-126, mEBS+13, mEBS-126 +13, mEBS+277 and mEBS-152 +277). Experiments were carried out in (A) HeLa and (B) Jurkat cells. Consensus EBS are indicated in Table VIII. Wild type and truncated versions of ETV6 were co-transfected in the cells along with the promoter constructs (Firefly luciferase) and the pRL-CMV internal control (Renilla luciferase). The relative luciferase activity (RLA) represents the ratio between the Firefly and Renilla luciferase activities. Data are presented as boxplot (whiskers: min to max) and compared using a One-Way ANOVA Kruskal-Wallis test combined with Dunn's multiple comparison test ($n = 3$). Two-sided p-values are indicated: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***)).

Figure 28. SPHK1, IL-18 and PTGER4 do not influence the cell cycle distribution over a period of 24 hours.

(A) Representative experiment of the cell cycle analysis of Reh wild-type/WT cells using a BrdU-FITC and 7-AAD double-staining. Barriers are indicated on the graph. The logarithmic y axis corresponds to the signal from the BrdU-FITC (FL-1 channel) and the linear x axis corresponds to the signal from the 7-AAD (FL-3 channel). 7-AAD+/BrdU-FITC- cells correspond to the G0/G1 and the G2/M phases of the cell cycle. 7-AAD+/BrdU-FITC+ positive cells correspond to the S phase of

the cell cycle. 7-AAD- cells correspond to the sub G0/G1 phase of the cell cycle. (B) Cell cycle distribution of Reh cells expressing the scrambled shRNA, the shRNAs SPHK1-A or SPHK1-B. (C) Cell cycle distribution of Reh cells expressing the pLenti or pLenti-IL-18. (D) Cell cycle distribution of Reh cells expressing the scrambled shRNA, the shRNAs PTGER4-C or PTGER4-D. Data are presented as mean \pm standard error (n = 3). and were compared using an unpaired t test (n = 3). Two-sided p-values are indicated: p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), and p < 0.001 (***).

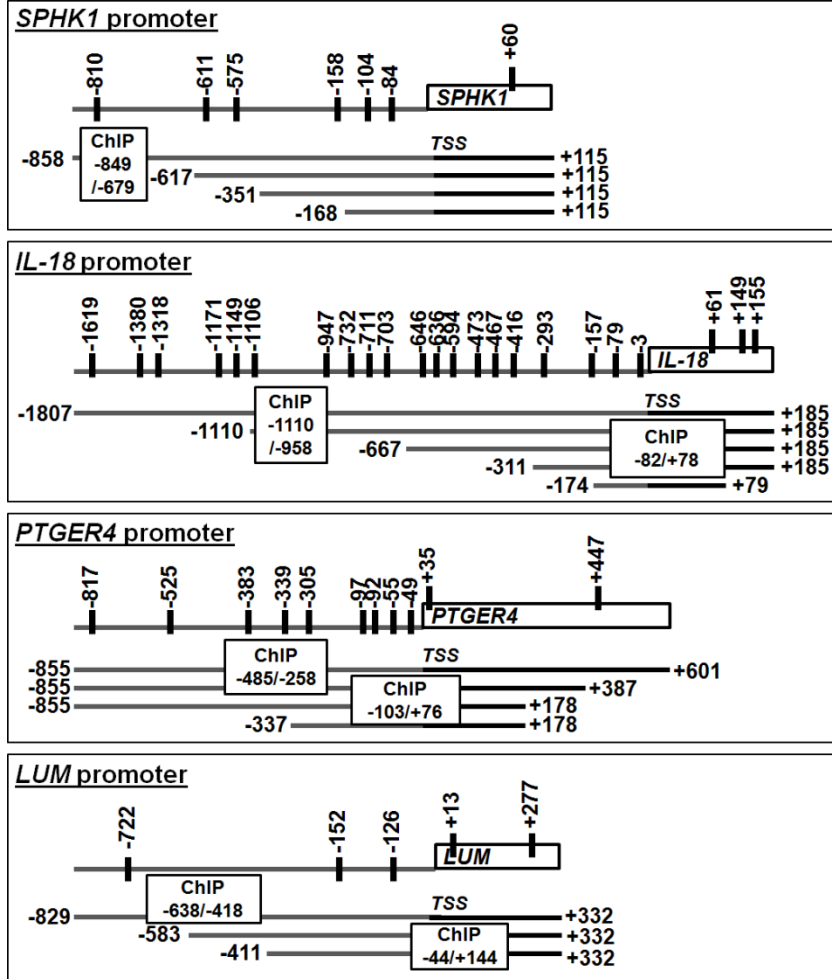
Figure 29. The DNA topoisomerase-II inhibitor camptothecin induces apoptosis in Reh cells.

DNA damage-induced apoptosis of Reh wild-type/WT cells using an AnnexinV-FITC and PI double-staining. Barriers are indicated on the graph. The logarithmic y axis corresponds to the signal from the PI (FL-3 channel) and the logarithmic x axis corresponds to the signal from the AnnexinV-FITC (FL-1 channel). AnnexinV-FITC-/PI- cells correspond to the viable population. AnnexinV-FITC+/PI- cells correspond to the early apoptosis cell population. AnnexinV-FITC+/PI+ cells correspond to the late-apoptosis and necrosis cell population.

3.11. Figures and Tables.

Figure 13. ETV6 binds the proximal promoters of *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM*.

A. The promoters of *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM* and their predicted EBS.



B. ETV6 occupies the promoters of *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM*.

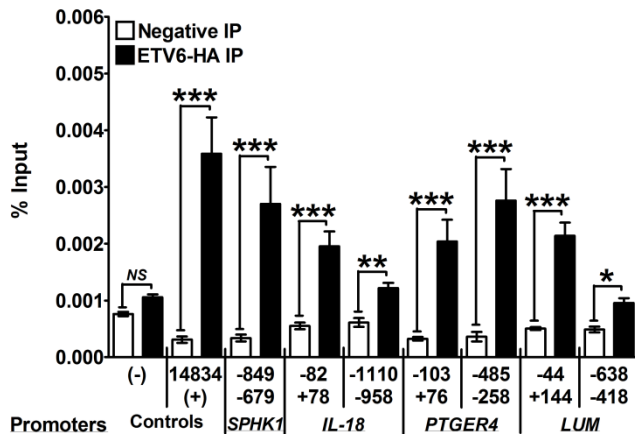
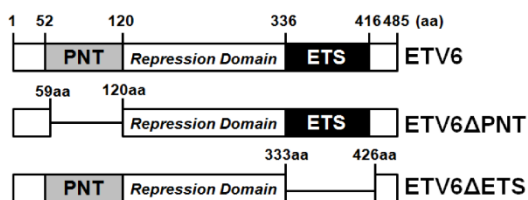
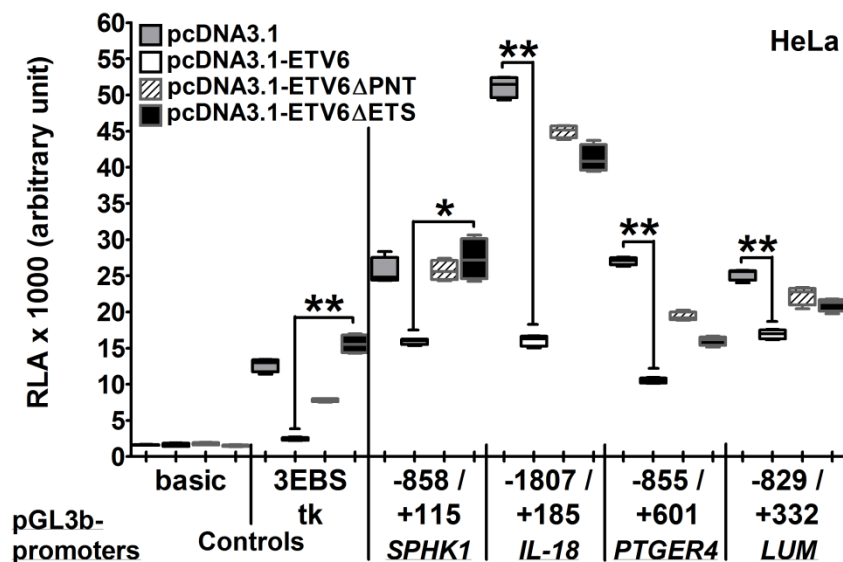


Figure 14. ETV6 regulates transcription through its PNT and ETS functional domains.

A. ETV6 and its truncated forms.



B. The PNT and ETS functional domains participate to the ETV6-mediated transcriptional repression in HeLa cells.



C. The PNT and ETS functional domains participate to the ETV6-mediated transcriptional repression in Jurkat cells.

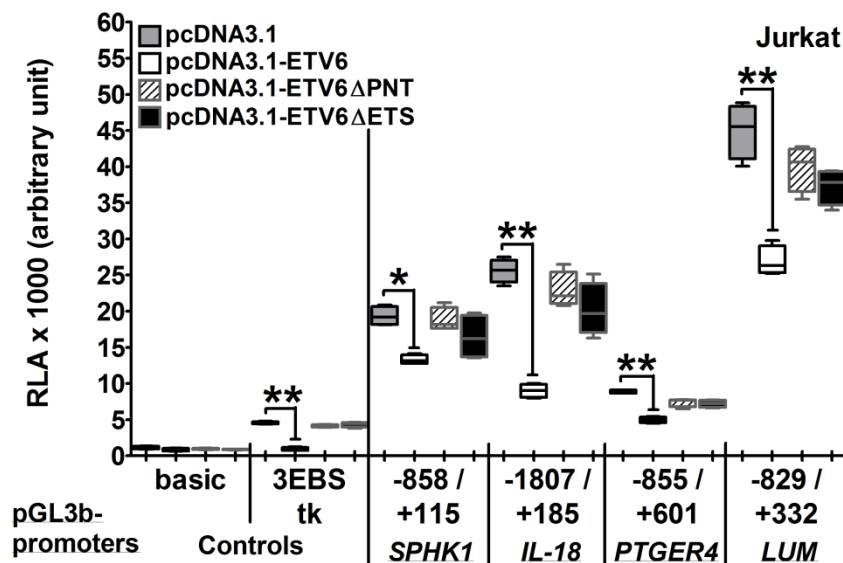


Table VIII. EBS are involved in the ETV6-mediated transcriptional repression, depending on the cellular context.

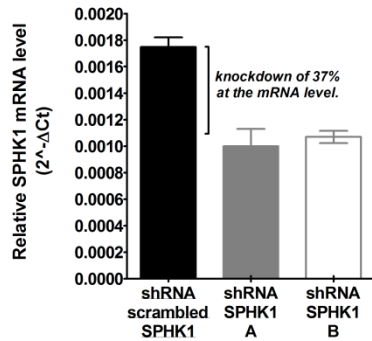
EBS	Prediction	WT <u>mEBS</u>	Promoter residual activity after ETV6 overexpression	
			HeLa	Jurkat
proSPHK1 -168/+115			0.59 ± 0.03 ^{REF}	0.55 ± 0.02 ^{REF}
-158	ETS_Q6	gCTT <u>C</u> Cta gCTT <u>G</u> Gta	0.80 ± 0.02 **	0.57 ± 0.08
-104	ETS1P54_01 ETS1P54_03	cggtgcCGGAGgcggcg cggtgcCCCAGgcggcg	0.79 ± 0.01 *	0.67 ± 0.06
-84	ETS1P54_01 ETS1P54_03	gaggcCGGAGgcggcg gaggcCCCAGgcggcg	0.70 ± 0.02	0.60 ± 0.04
+60	ETS1P54_03	gaggcCGGAGggagcg gaggcCCCAGggagcg	0.82 ± 0.02 ***	0.68 ± 0.02
proIL-18 -178/+79			0.51 ± 0.01 ^{REF}	0.39 ± 0.00 ^{REF}
-157	ETS1P54_02 ETS1P54_03	ttttaCGGAAGaaaag ttttaCCCAAGaaaag	0.25 ± 0.00 ***	0.47 ± 0.05
-79	ETS1P54_02	cgacTT <u>C</u> CAAttgc cgacTT <u>G</u> GAAttgc	0.36 ± 0.01	0.67 ± 0.03
-3	ETS_Q6 ETS1P54_02	cttcTT <u>C</u> CTcatt cttcTT <u>G</u> GTcatt	0.62 ± 0.01	NA
+61	ETS1P54_02	agcaAGGAAttgt agcaACCAAttgt	0.45 ± 0.02	0.66 ± 0.03
-157 -79 -3	<i>As above</i>	<i>As above</i>	0.90 ± 0.02 ***	0.58 ± 0.09
proPTGER4 -337/+178			0.50 ± 0.01 ^{REF}	0.56 ± 0.06 ^{REF}
-305	ETS1P54_01 ETS1P54_02	ccactGGAAGccg ccactCCAAGccg	0.60 ± 0.02	0.57 ± 0.12
-97	GABPB1.01	tccgccccTT <u>C</u> CAatccg tccgccccTT <u>G</u> GAatccg	0.71 ± 0.02 *	0.64 ± 0.04
-92	ETS1P54_03	ctccaAT <u>C</u> Cggccaa ctccaAT <u>G</u> Gggccaa		
-55	ETS1P54_03	gtttgcCT <u>C</u> Cgcctcc gtttgcCT <u>G</u> Ggcctcc	0.75 ± 0.03 **	0.79 ± 0.06
-49	ETS1P54_03	ctccgcCT <u>C</u> Cgccagg ctccgcCT <u>G</u> Ggccagg		
+35	ETS_Q6 ETS1P54_02	cgagAGGAAGatg cgagACCAAGatg	0.62 ± 0.02	0.65 ± 0.04
proLUM -411/+332			0.56 ± 0.02 ^{REF}	0.39 ± 0.03 ^{REF}
-126	ETS1P54_02	cgttTT <u>C</u> CTgaaa cgttTT <u>G</u> GTgaaa	0.66 ± 0.03	0.73 ± 0.06
+13	ETS_Q6 ETS1P54_02	gagcTT <u>C</u> CTtatt gagcTT <u>G</u> GTtatt	0.63 ± 0.03	0.70 ± 0.05
+277	ETS1P54_02 ETS1P54_03	ccagTT <u>C</u> CGtcct ccagTT <u>G</u> GGtcct	0.71 ± 0.03	0.80 ± 0.04 *
-152	ETS1P54_02	tcaaTT <u>C</u> CTctga tcaaTT <u>G</u> GTctga	0.64 ± 0.03	0.92 ± 0.10 **
+277	<i>As above</i>	<i>As above</i>		
-126	<i>As above</i>	<i>As above</i>	0.77 ± 0.01	0.61 ± 0.11
+13	<i>As above</i>	<i>As above</i>		

Site-directed mutagenesis of predicted consensus Ets-binding site (EBS) located in the classic and alternative basal promoters of *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* and *LUM*.

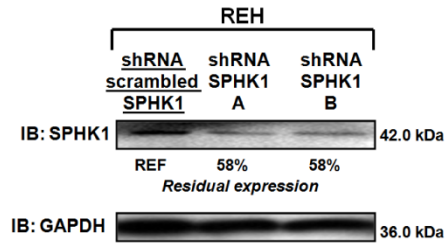
EBS; consensus EBS and position, according to the transcription start site (+1): Prediction; according to Transfac: WT; wild-type consensus EBS: mEBS; mutated consensus EBS: Promoter residual activity after ETV6 overexpression; a ratio between the relative luciferase activity when ETV6 is overexpressed versus the basal activity of the promoter (mean \pm standard deviation). Statistical differences were measured using a Two-Way ANOVA with a Bonferoni post test (WT promoter versus mEBS promoter). Two-sided p-value are indicated: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***)

Figure 15. SPHK1 is a positive regulator of leukemia cell survival and migration.

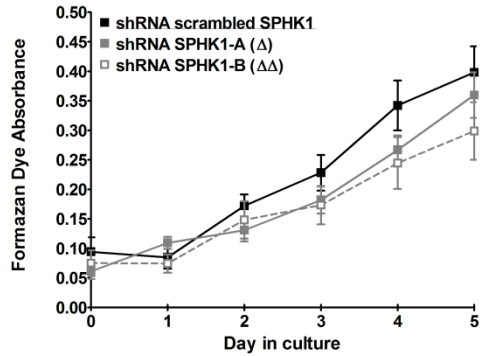
A. qPCR of SPHK1 mRNA in Reh cells.



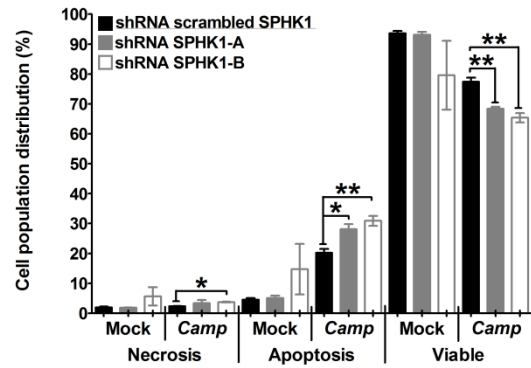
B. Immunoblot of SPHK1 protein in Reh cells.



C. Knockdown of SPHK1 expression decelerates Reh cell proliferation.



D. SPHK1 is a negative regulator of DNA damage-induced apoptosis in Reh cells.



E. SPHK1 facilitates Reh cell migration through the CXCL12/CXCR4 signalling pathway.

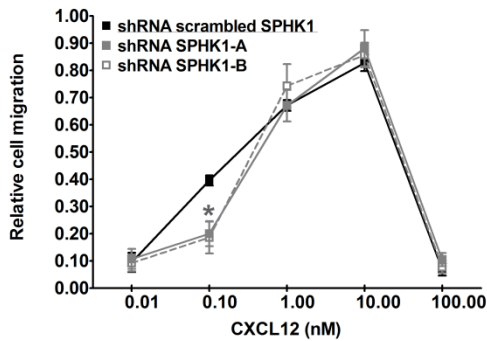
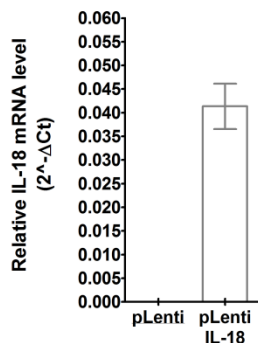
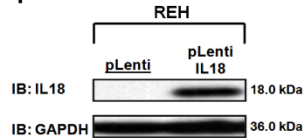


Figure 16. IL-18 affects Reh cell migration through the CXCL12/CXCR4 pathway.

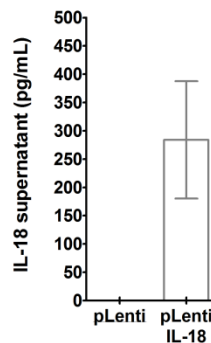
A. qPCR of IL-18 mRNA in Reh cells.



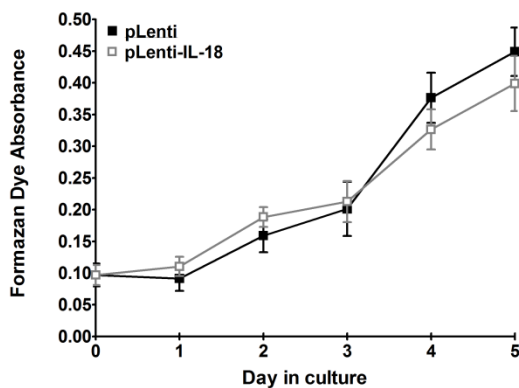
B. Immunoblot of IL-18 protein in Reh cells.



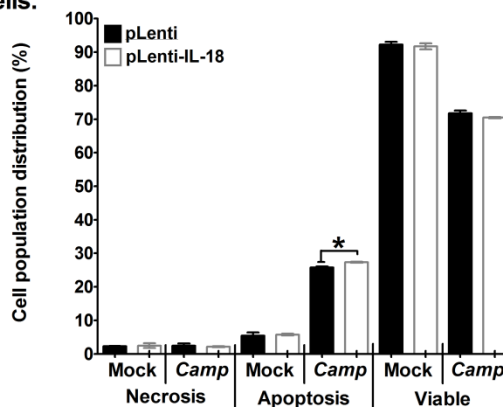
C. Reh cells can export IL-18 to their extracellular environment.



D. IL-18 does not affect Reh cell proliferation.



E. IL-18 slightly increases the DNA damage-induced apoptotic response in Reh cells.



F. IL-18 favours Reh cell migration through the CXCL12/CXCR4 signalling pathway.

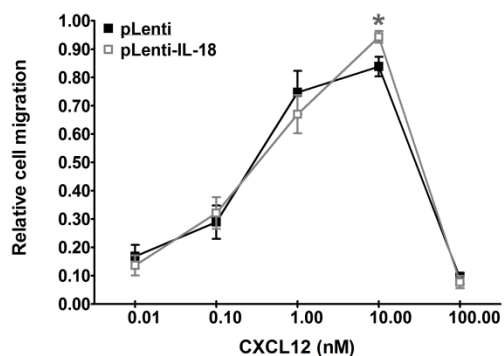
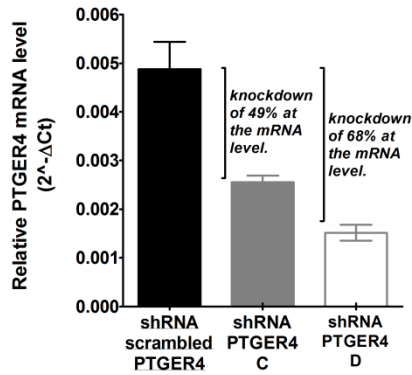
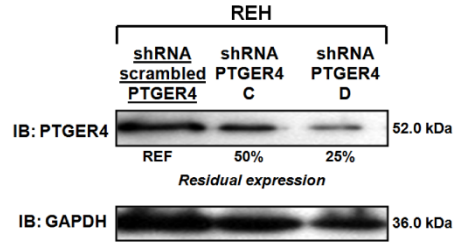


Figure 17. PTGER4 is involved during leukemia cell proliferation and migration through the CXCL12/CXCR4 pathway.

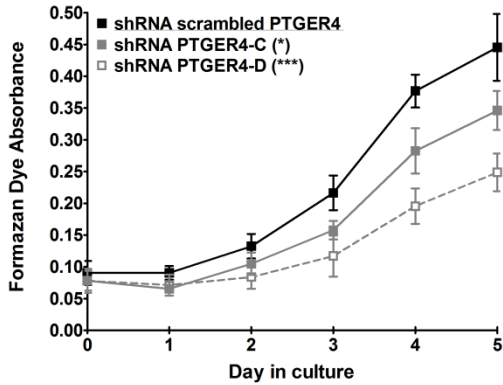
A. qPCR of PTGER4 mRNA in Reh cells.



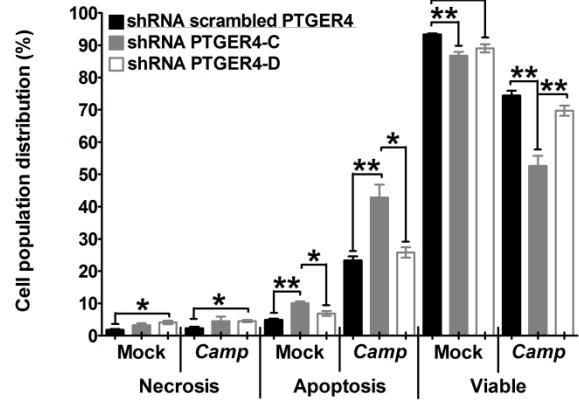
B. Immunoblot of PTGER4 protein in Reh cells.



C. PTGER4 modulates positively Reh cell proliferation.



D. PTGER4 expression is determinant to DNA damage-induced apoptosis.



E. PTGER4 facilitates Reh cell migration through the CXCL12/CXCR4 signalling pathway.

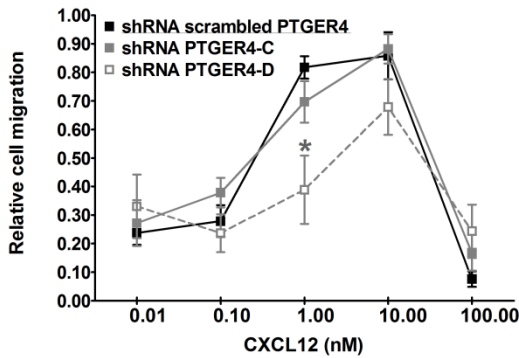
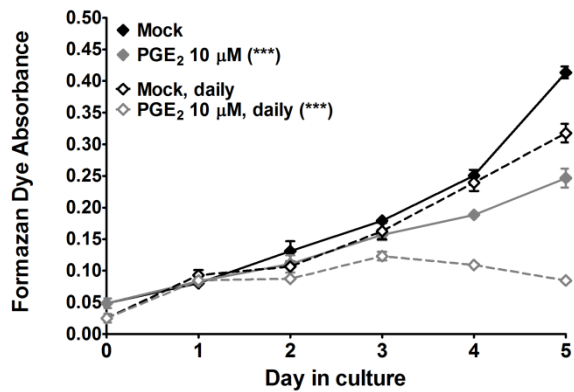


Figure 18. PGE₂ and the PTGER4 antagonist L-161982 both decelerate Reh cell proliferation.

A. PGE₂ decelerates Reh cell proliferation.



B. L-161982, a specific antagonist to PTGER4, decelerates Reh cell proliferation.

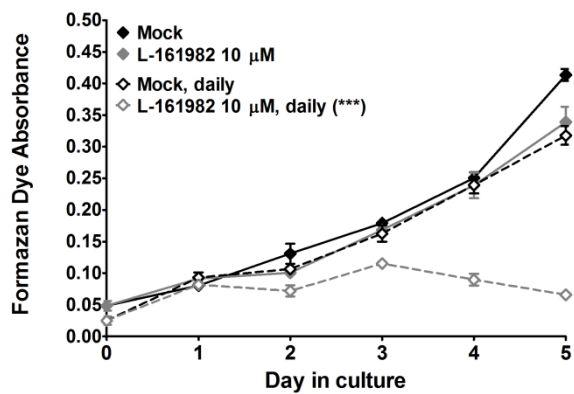
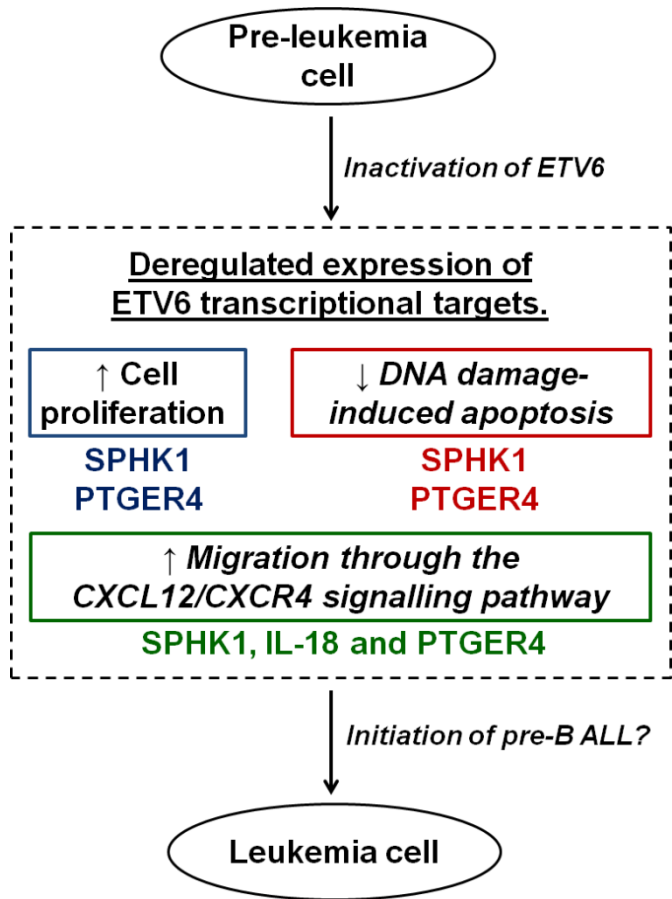


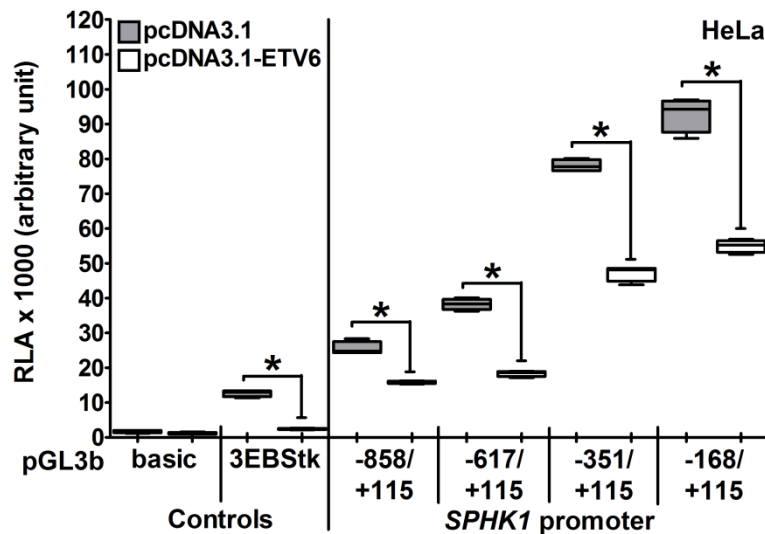
Figure 19. SPHK1, IL-18 and PTGER4 are involved in childhood pre-B ALL.



3.12. Supplementary figures and tables.

Figure 20. *SPHK1* is a transcriptional target of ETV6.

A. ETV6 represses the activity of the *SPHK1* promoter in HeLa cells.



B. ETV6 represses the activity of the *SPHK1* promoter in Jurkat cells.

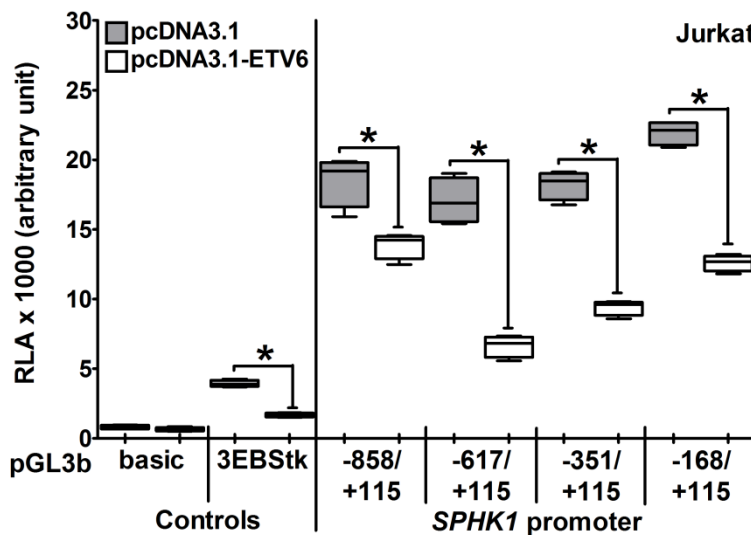


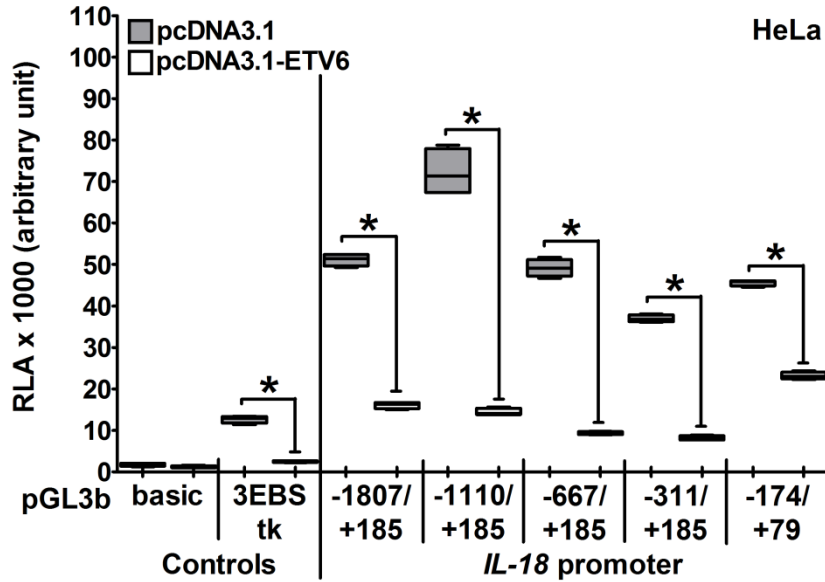
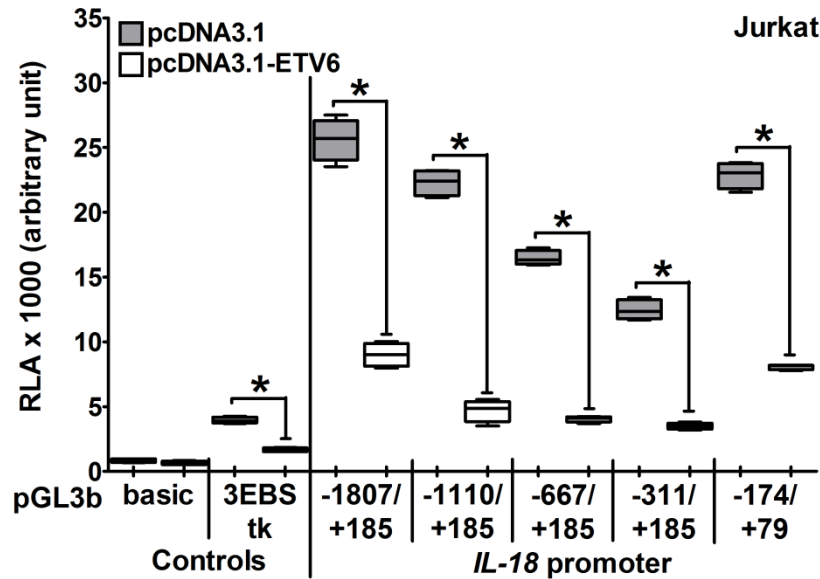
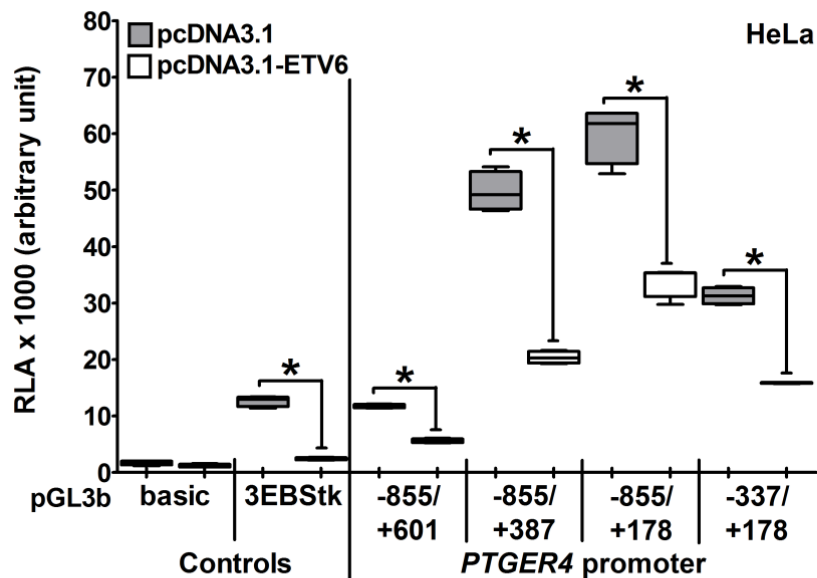
Figure 21. *IL-18* is a transcriptional target of ETV6.A. ETV6 represses the activity of the *IL-18* promoter in HeLa cells.B. ETV6 represses the activity of the *IL-18* promoter in Jurkat cells.

Figure 22. *PTGER4* is a transcriptional target of ETV6.

A. ETV6 represses the activity of the *PTGER4* promoter in HeLa cells.



B. ETV6 represses the activity of the *PTGER4* promoter in Jurkat cells.

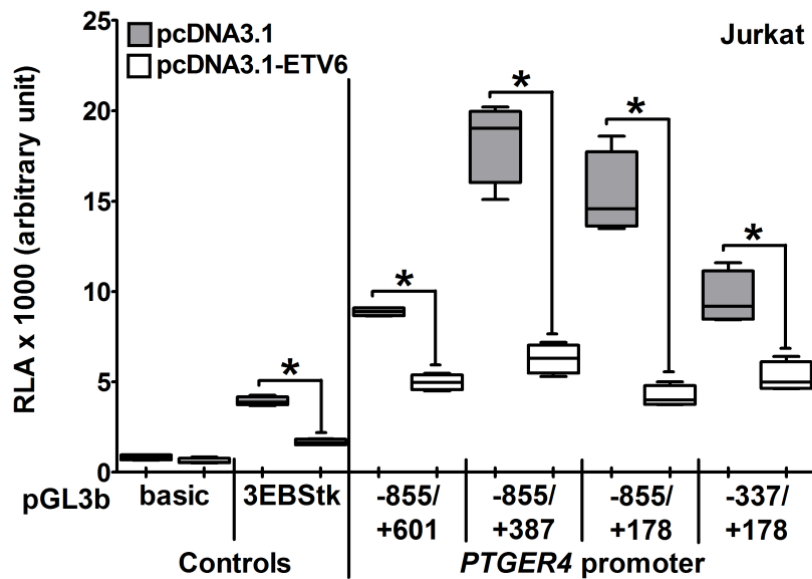
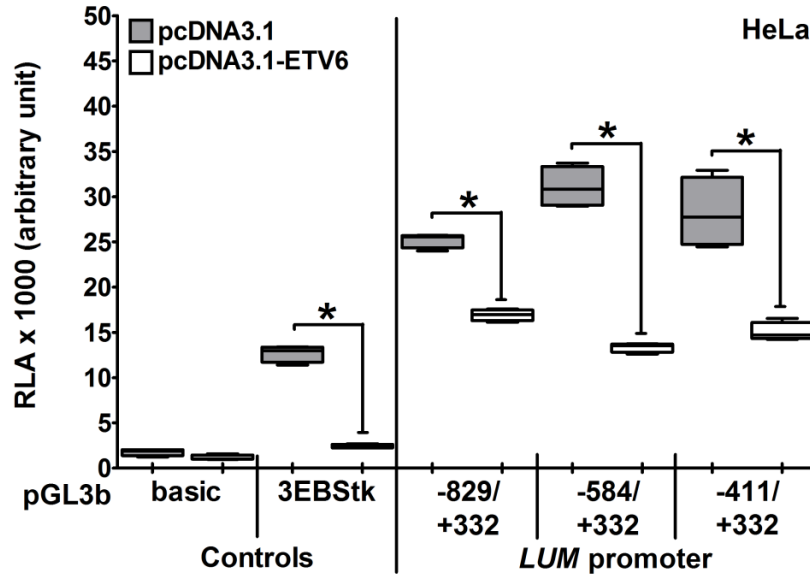


Figure 23. *LUM* is a transcriptional target of ETV6.

A. ETV6 represses the activity of the *LUM* promoter in HeLa cells.



B. ETV6 represses the activity of the *LUM* promoter in Jurkat cells.

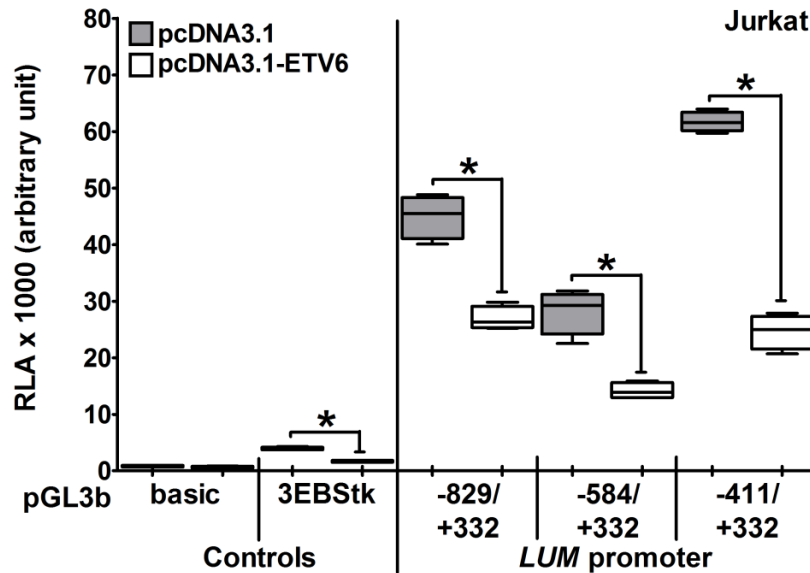
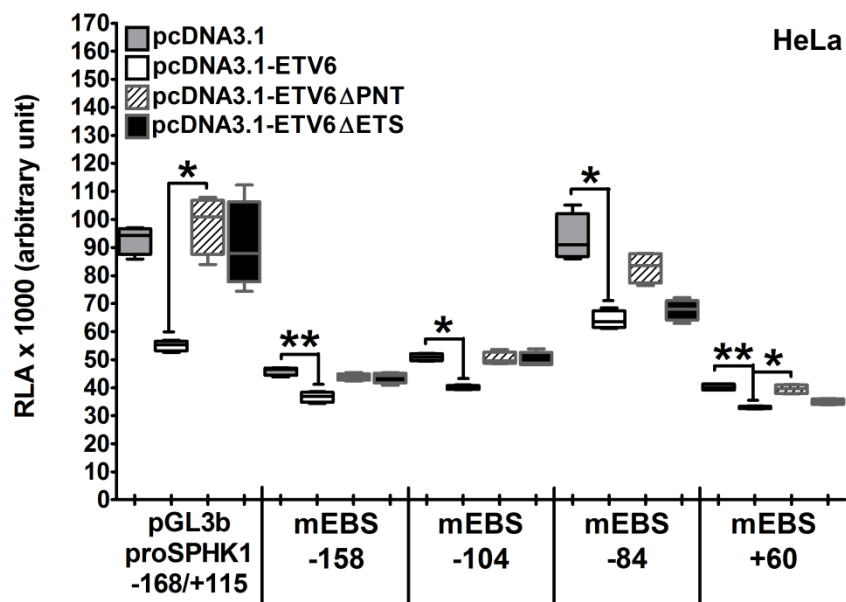


Figure 24. Ets-Binding Sites are implicated in the ETV6-mediated transcriptional repression of the *SPHK1* promoter in HeLa cells.

A. ETV6 recognizes EBS -158, EBS-104 and EBS +60 of the *SPHK1* promoter in HeLa cells.



B. ETV6 does not recognize consensus EBS of the *SPHK1* promoter in Jurkat cells.

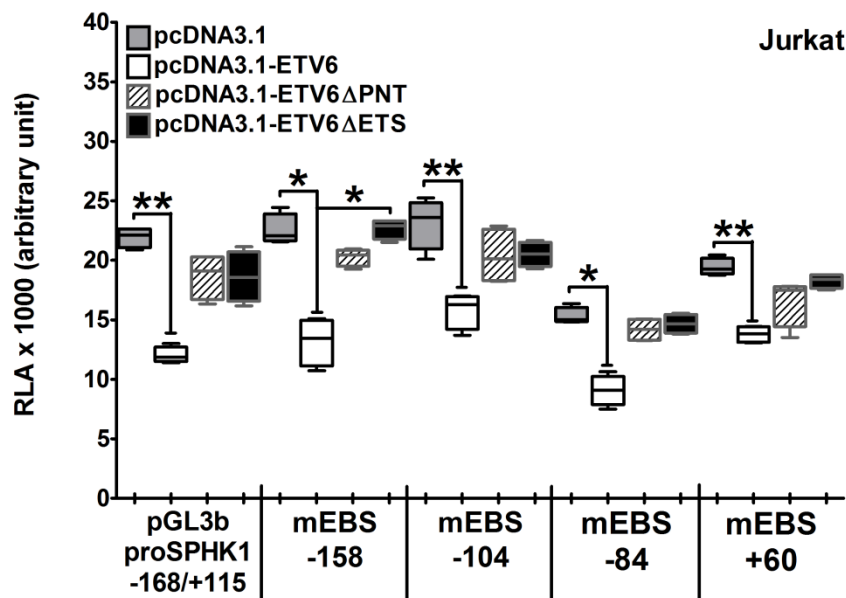
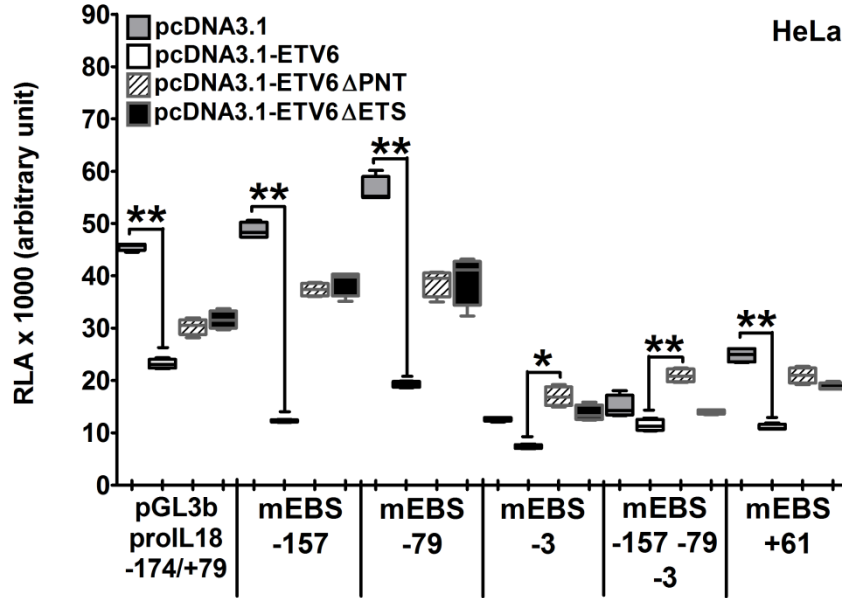


Figure 25. Ets-Binding Sites are implicated in the ETV6-mediated transcriptional repression of the *IL-18* promoter in HeLa cells.

A. EBS -157, EBS -79 and EBS -3 of the *IL-18* promoter are recognized by ETV6 in HeLa cells.



B. In Jurkat cells, EBS do not participate to the ETV6-mediated transcriptional repression of the *IL-18* promoter.

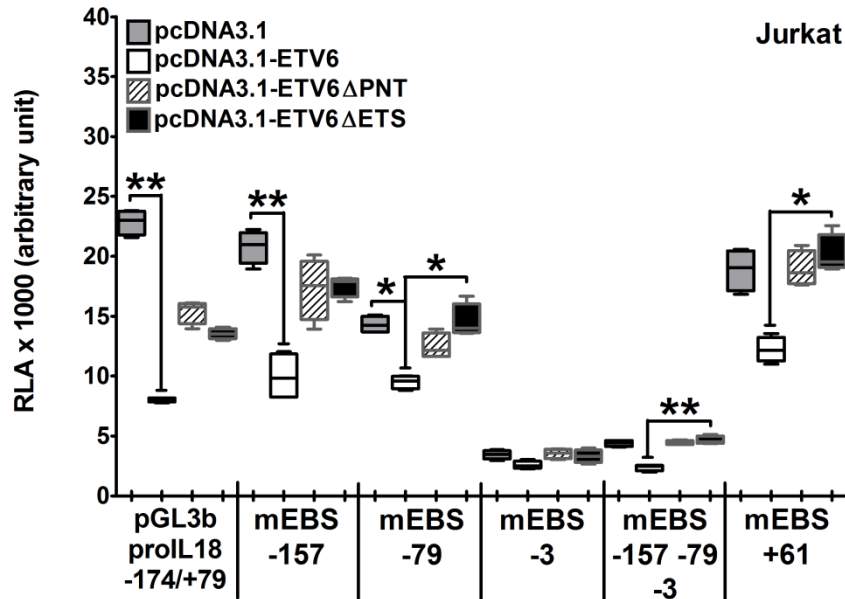
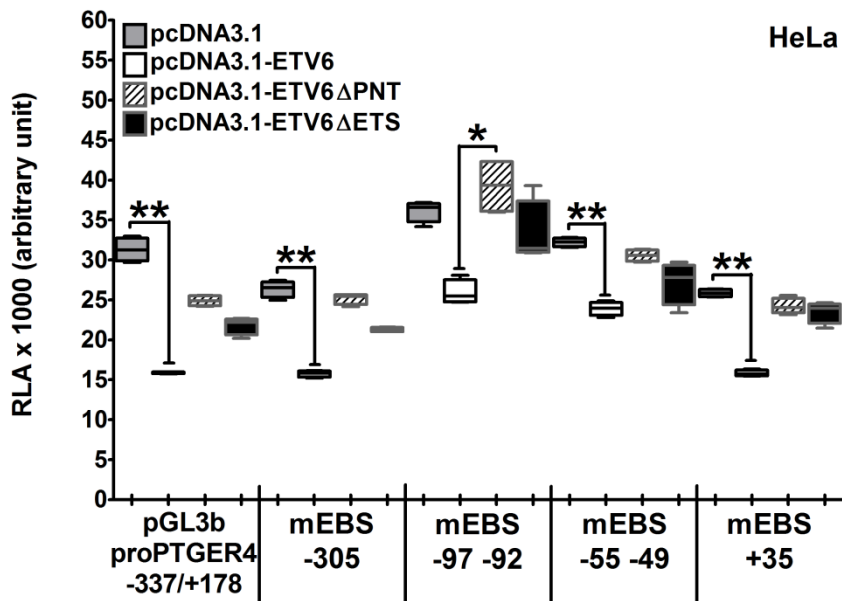


Figure 26. Ets-Binding Sites are implicated in the ETV6-mediated transcriptional repression of the *PTGER4* promoter in HeLa cells.

A. ETV6 recognizes the EBS -97, EBS -92, EBS -55 and EBS -49 of the *PTGER4* promoter in HeLa cells.



B. Consensus EBS of the *PTGER4* promoter are not recognized by ETV6 in Jurkat cells.

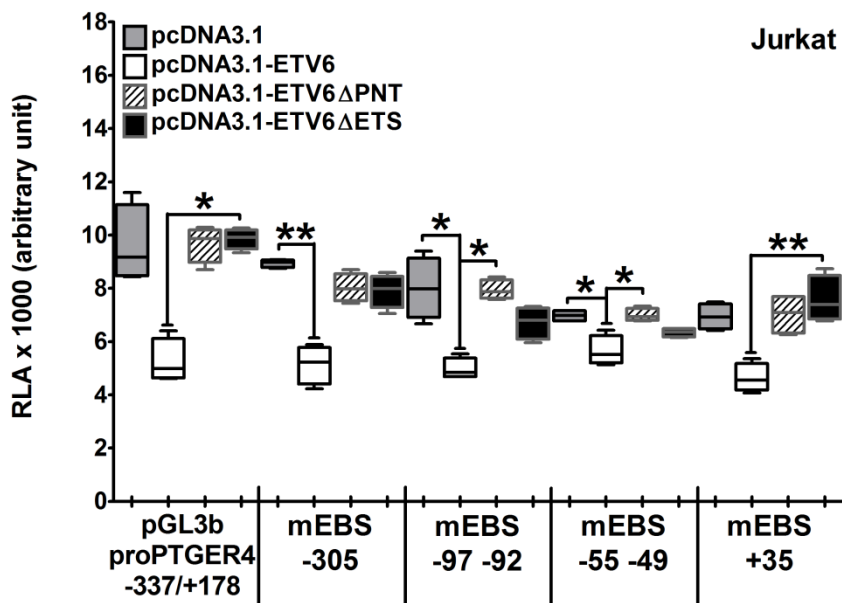
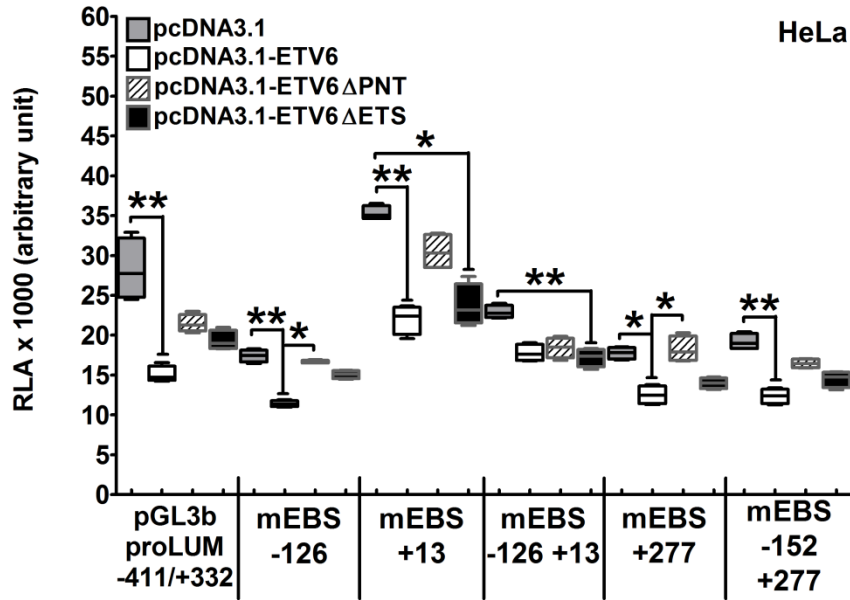


Figure 27. Ets-Binding Sites are implicated in the ETV6-mediated transcriptional repression of the *LUM* promoter in Jurkat cells.

A. In HeLa cells, ETV6 does not recognize consensus EBS of the *LUM* promoter.



B. ETV6 recognizes consensus EBS -152 and EBS +277 of the *LUM* promoter in Jurkat cells.

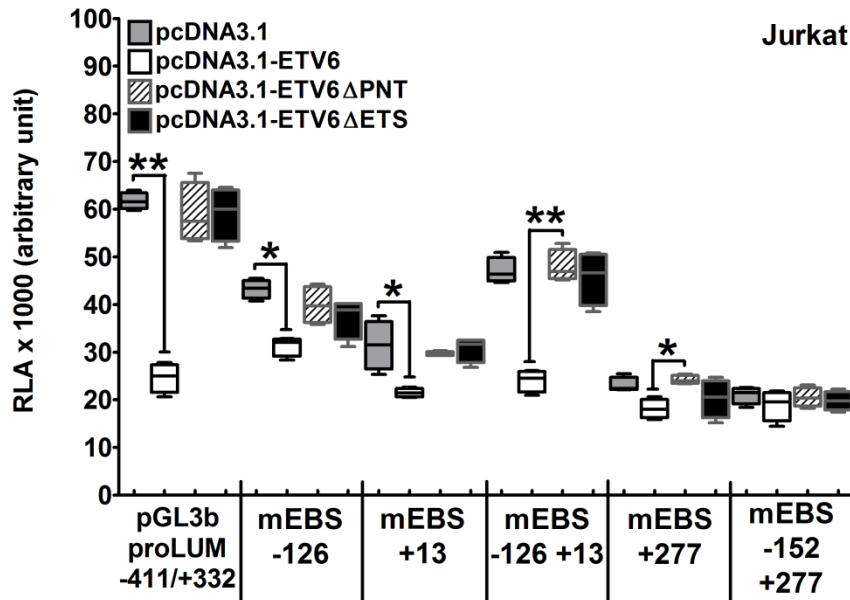
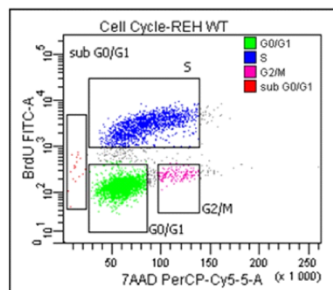
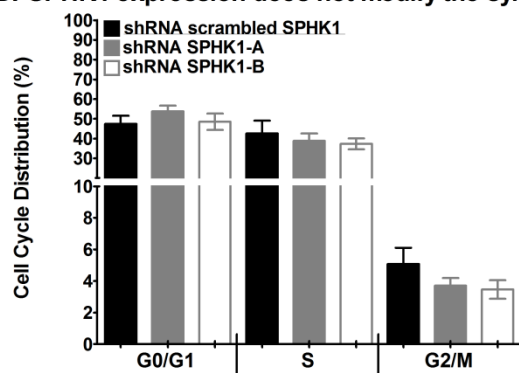


Figure 28. SPHK1, IL-18 and PTGER4 do not influence the cell cycle distribution over a period of 24 hours.

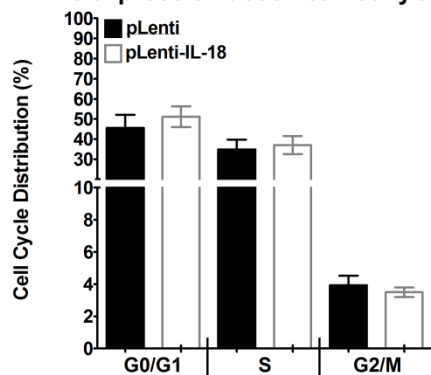
A. Synchronized Reh cell cycle profile on a 24-hour period.



B. SPHK1 expression does not modify the synchronized Reh cell cycle profile on a 24-hour period.



C. IL-18 expression does not modify the synchronized Reh cell cycle profile on a 24-hour period.



D. PTGER4 expression does not modify the synchronized Reh cell cycle profile on a 24-hour period.

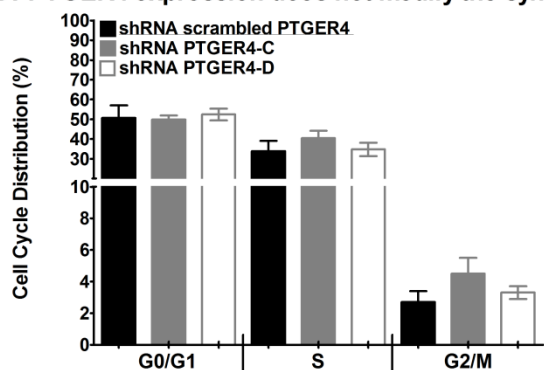


Figure 29. The DNA topoisomerase-II inhibitor camptothecin induces apoptosis in Reh cells.

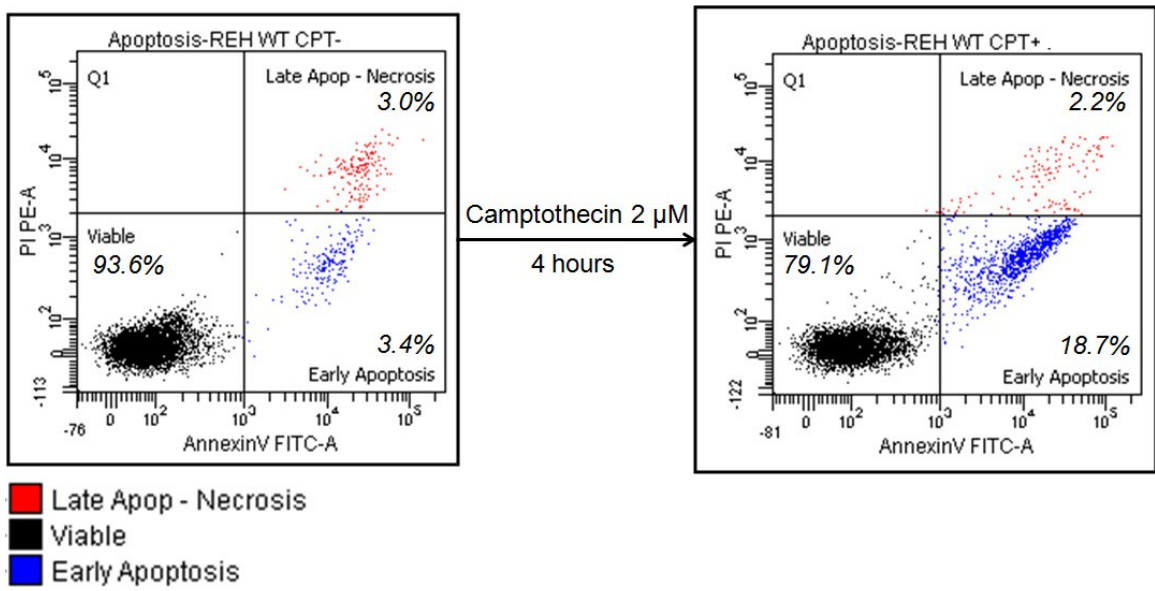


Table IX: Primers used for molecular cloning, site-directed mutagenesis and chromatin immunoprecipitation.

Name	Sequence (5' to 3')
Molecular cloning	
proSPHK1-858.R	agaggtcgaccggattcctggagcaag
proSPHK1-617.F	agaggtcgaccggtccctactggcctc
proSPHK1-351.GW.R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtacacgagttcgcgcgga
proSPHK1-168.GW.R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttgcgcttctaggacc
proSPHK1+115.F	agagaagcttcccacgtctgagggactg
proSPHK1+115.GW.F	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctcccacgtctgagggactg
proL18-1807.F	agagacgcgtcccaagggtctgggaaatac
proL18-1110.F	agagacgcgttcccgaatgaaaacccta
proL18-667.F	agagacgcgttccctctcccagcttact
proL18-311.F	agagacgcgtgtgctgaagtgtgaccagga
proL18-174.GW.F	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctagagccccacttttacggaag
proL18+185.R	agagacatctaagcgtctggaaggctga
proL18+79.GW.R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtgactgggagacaattccttg
proPTGER4-855.F	agagacgcgtaagctcacgctacccttca
proPTGER4-337.GW.F	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctaaacggtcgccggttctcagt
proPTGER4+601.R	agagagatctctgcttcttaccctgta
proPTGER4+381.R	agagagatctccgaggctcagagttgcc
proPTGER4+178.R	agagagatctagctctggctgcctc
proPTGER4+178.GW.R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtagctctggctgcctcc
proLUM-829.F	agagacgcgtccacaagtctcactgctaaaatc
proLUM-583.F	agagacgcgtgcttgggagattattac
proLUM-411.F	agagacgcgtgaattcctaaacgaaatcc
proLUM+332.R	agagctcgaggcagatgcactatggacaaga
Site-directed mutagenesis	
proSPHK1.mEBS-158	ttgccgcttgtaggaccggcggaacc
proSPHK1.mEBS-104	ggcgtgcccaggcgcgctgagg
proSPHK1.mEBS-84	gctgaggcccaggcgggcagaggccg
proSPHK1.mEBS+57	gtttgaggcccaggagcagggccggg
proL18.mEBS-157	ggcacagagcccaactttaccgaagaaagatttc
proL18.mEBS-79	gccactttattcgactggattgccctaggaaagagcc
proL18.mEBS-3	ccctccacctctgtcattctctcccag
proL18.mEBS+61	ctgcctggacagtcagcaaccaattgtctcccagtc
proPTGER4.mEBS-305	cagtgtggccccactccaagcggagttcagg
proPTGER4.mEBS-97/-92	gctccgcccccttggaaatgggccaatgggc
proPTGER4.mEBS-55/-49	cgcggttgcctgggctgggccaaggaaacttg
proPTGER4.mEBS+35	cagcccagaccaagatgaacagcccaggc
proLUM.mEBS-152	gggcaaagggattcaattggctgagctgttcattgcg
proLUM.mEBS-126	gggattcaattcctctgagctgttcatttgcgttttggtgaaattatttggcc
proLUM.mEBS+13	aatgttctcacagtgagctgttatttgaagcaggactc
proLUM.mEBS+277	ggcagccagttgggtcctgacagagttcacagc
ETV6.ΔPNT.Pacl	caactgcgctgcagtaattaactggagcagggtgac
ETV6.ΔPNT.Pacl	gtgctctatgaactcctcagcatttaattaagcagaggaaacctcg
ETV6.ΔETS.KpnI	caggccatgccattgtaccatagcagactgtagactg
ETV6. ΔETS.KpnI	gtttatgaaaaccccagatgtaccatgagtgccgaacagac
Chromatin Immunoprecipitation	
14834.chip.F (+)	ttgcccaatcatttccttc
14834.chip.R (+)	cctcatgtgactgacacg
Negative.chip.F (-)	atggtgcccactgggatct
Negative.chip.R (-)	tgccaaagcctaggggaaga
proSPHK1-849.chip.F	actggcctccaaagaagtga

Table IX: Primers used for molecular cloning, site-directed mutagenesis and chromatin immunoprecipitation (continued).

Name	Sequence (5' to 3')
proSPHK1-679. chip.R	ggagaggaggcttgacagtg
proL18-82. chip.F	ttcattgccctaggaaaga
proL18+79. chip.R	gcactgggagacaattcctt
proL18-1110. chip.F	ttccgaaatgaaaacccta
proL18-859. chip.R	agcaagggtggcattttgtt
proPTGER4-103. chip.F	gcttagccgctcctgaact
proPTGER4+76. chip.R	agcgagacaccgtatttct
proPTGER4-258. chip.F	gcttagccgctcctgaact
proPTGER4-485. chip.R	agcgagacaccgtatttct
proLUM-44. chip.F	gccacagccacagatgtaa
proLUM+144. chip.R	taacgaagtgcagggtgaacg
proLUM-638. chip.F	ctcatttctgaaaccatgc
proLUM-418. chip.R	aaccttactggggagagca
shRNA and scrambled shRNA	
shRNA SPHK1-A	ccgggcaggcatatggagatgaatctcgagattcactccatagcctgcttttg
shRNA SPHK1-B	ccggcctgaccaactgcacgctattctcgagaatagcgtgcagttggcagggttttg
shRNA scrambled SPHK1	ccgggagtcctacgcctacatctcgagatgatgaggcgtagggactctttt
shRNA PTGER4-C	ccggctcacgctctttgcagtctatctcgagatagactgcaagagcgtgagtttt
shRNA PTGER4-D	ccgggtactgtttctggacccttatctcgagataagggtccagaaacagacttttt
shRNA scrambled PTGER4	ccgggctctcttctatgctagactctcgagagtctagcataggaagagagctttt

Name of the primer and their respective nucleotide sequences are indicated.

Chapitre 4. Discussion.

4.1. Mise en contexte.

La majorité des enfants atteints d'une LLA pré-B et possédant une translocation t(12;21) présentent également une délétion de l'allèle résiduel de *ETV6*. Ceci entraîne une perte d'expression permanente du facteur de transcription *ETV6* chez le lymphocyte pré-B leucémique. À ce jour, nous possédons peu d'indices sur le réseau de régulation transcriptionnelle du facteur de transcription *ETV6*. Ce manque d'information nuit à l'identification des processus biologiques responsables du développement de la LLA pré-B pédiatrique. Le but de cette étude est de comprendre les conséquences biologiques de l'inactivation du facteur de transcription *ETV6* dans le contexte de la leucémogénèse pédiatrique.

Cette étude a mené à l'identification de six cibles transcriptionnelles du facteur de transcription *ETV6*: *TP53* (p53 et $\Delta 133p53$), *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* et *LUM*. L'expression de ces gènes est modulée par *ETV6* chez les enfants atteints de la LLA pré-B.¹⁴⁹ Des études fonctionnelles ont été réalisées pour comprendre davantage le rôle des gènes *SPHK1*, *IL-18* et *PTGER4* dans la leucémogénèse pédiatrique.

Les résultats de cette étude sont discutés en deux sections. Premièrement, cette étude amène de nouvelles connaissances sur les mécanismes moléculaires régissant la répression transcriptionnelle par *ETV6* (*section 4.2.*). Les résultats seront intégrés par rapport à nos connaissances sur les autres facteurs de transcription de la famille Ets. Deuxièmement, les études fonctionnelles améliorent notre compréhension du rôle des cibles transcriptionnelles de *ETV6* dans la

leucémogénèse pédiatrique (*section 4.3.*). Les résultats seront intégrés avec le contexte pathophysiologique de la LLA pré-B de l'enfant.

4.2. Le réseau de régulation transcriptionnelle de ETV6.

4.2.1. Six nouvelles cibles transcriptionnelles de ETV6.

La régulation de l'expression d'un gène requiert de nombreuses étapes qui sont sujettes à un contrôle fin. Le facteur de transcription ETV6 est capable de lier l'ADN.¹¹⁸ Plusieurs techniques sont disponibles pour identifier une interaction entre une protéine comme ETV6 et le promoteur de ses nouvelles cibles potentielles. Dans le cadre de mon projet, nous avons privilégié la technique de l'immunoprécipitation de la chromatine. Contrairement à des expériences de retard sur gel, cette stratégie permet de capturer une interaction ADN-protéine dans un contexte *in vivo*.

Nos études d'immunoprécipitation de la chromatine montrent que le facteur de transcription ETV6 occupe le promoteur proximal des gènes *TP53* (promoteurs P1 et P2), *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* et *LUM*. L'outil bio-informatique Transfac a d'ailleurs identifié des sites prédits pour la séquence consensus EBS dans le promoteur proximal des gènes étudiés.¹⁵⁹

Une étude récente a mené à l'identification du promoteur alternatif (promoteur P2) de *TP53*.¹⁵⁶ Celui-ci est situé à l'intérieur de l'intron 4 du locus de *TP53* et est responsable de l'expression du transcrit $\Delta 133p53$. Comme le rôle du gène *TP53* dans la leucémogénèse pédiatrique est encore ambiguë, nous avons

aussi étudié la répression transcriptionnelle médiée par ETV6 sur le promoteur alternatif de *TP53*. Les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré un enrichissement d'ETV6 dans le promoteur alternatif de *TP53*. Celui-ci possède plusieurs sites EBS, suggérant qu'il pourrait être régulé par un facteur de transcription de la famille Ets comme ETV6. Il est intéressant de souligner que l'activité basale du promoteur alternatif de *TP53* augmente lorsque la région -1295 à +14 est retirée, suggérant ainsi la présence d'un ou plusieurs éléments de répression transcriptionnelle. Étant donné que l'isoforme $\Delta 133p53$ pourrait agir à titre d'oncogène dominant, son expression doit être relativement faible dans des conditions physiologiques.

La découverte du promoteur alternatif de *TP53* est récente. Il n'existe donc pas encore beaucoup de données sur les facteurs de transcription qui en régulent l'activité. À notre connaissance, une autre étude a permis de confirmer que le facteur de transcription p53 régule la transcription du promoteur alternatif de *TP53*. P53 active la transcription de l'isoforme $\Delta 133p53$, surtout en présence d'actinomycine-D. Aoubala et al. ont noté que l'enrichissement de p53 sur le promoteur alternatif de *TP53* augmentait suite à une exposition à l'actinomycine-D des cellules cancéreuses du sein MCF-7.¹⁶⁰ L'actinomycine-D agit comme agent anti-mitotique via une inhibition de la transcription génétique. Par contre, lors de la découverte de l'isoforme $\Delta 133p53$, il a été montré qu'une exposition à l'actinomycine-D ne modifie pas le niveau d'expression de la protéine $\Delta 133p53\beta$ dans les cellules MCF-7.¹⁵⁶ Il n'y a donc pas de consensus sur l'effet biologique d'une exposition à l'actinomycine-D sur l'expression de l'isoforme $\Delta 133p53$.^{156,160}

Cette étude suggère que le promoteur alternatif de *TP53* peut être occupé par le facteur de transcription Ets dans des conditions basales.

La reconnaissance d'une région génomique par un facteur de transcription suggère la présence d'une région régulatrice. Pour confirmer la régulation transcriptionnelle médiée par ETV6 sur les promoteurs des gènes étudiés, nous avons réalisé des essais luciférases dans deux lignées cellulaires humaines: HeLa et Jurkat. Puisque l'expression du facteur de transcription ETV6 est ubiquitaire, il est intéressant d'étudier les mécanismes moléculaires responsables de la répression transcriptionnelle dans des contextes cellulaires différents. Le promoteur des gènes *TP53*-P1 (-2223 à +80), *TP53*-P2 (-1295 à +290), *SPHK1* (-858 à +115), *IL-18* (-1807 à +185), *PTGER4* (-855 à +601) et *LUM* (-829 à +332) a été cloné en amont du gène rapporteur « Firefly luciferase ». Par des expériences de transfections transitoires, nous avons démontré que la surexpression du répresseur transcriptionnel ETV6 diminue l'activité des promoteurs des gènes *TP53* (p53 et Δ 133p53), *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* et *LUM*. Ces résultats complètent les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine qui montrent que ETV6 occupe les promoteurs des gènes étudiés. La combinaison de ces résultats a permis l'identification de six nouvelles cibles transcriptionnelles directes de ETV6 sur un total de 8 (*Tableau X*).

Tableau X. : Les cibles transcriptionnelles connues de ETV6.

Gène	Cible transcriptionnelle		Référence
	Directe	Indirecte	
p53	x		Malouf et al. (en préparation)
Δ133p53	x		
SPHK1	x		
IL-18	x		
PTGER4	x		
LUM	x		Malouf et al. (en préparation)
MMP-3	x		Fenrick et al. (2000) <i>Molecular and Cellular Biology</i> 20
Bcl-X _L	x		Irvin et al. (2003) <i>JBC</i> 278
MCSFR		x	Fears et al. (1997). <i>PNAS USA</i> 94
GpIbα		x	Kwiatkowski et al. (1998). <i>JBC</i> 273
GPIX		x	

Cible transcriptionnelle directe: validation par des essais de gène rapporteur et des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine et/ou de retard sur gel. Cible transcriptionnelle indirecte: validation par des essais de gène rapporteur, sans confirmation ou détection de l'interaction entre ETV6 et la chromatine.

4.2.2. ETV6 réprime la transcription dans une région près du promoteur de base.

Il existe une abondance de sites prédits pour la séquence consensus EBS à travers les promoteurs proximaux humains.¹⁶¹ Plusieurs études ont rapporté la reconnaissance des EBS situés dans le promoteur proximal d'un gène par un facteur de transcription de la famille Ets. Les activateurs transcriptionnels ETS1 et ETS2 interagissent avec un complexe protéique impliqué dans le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base nommé CBP/p300.¹⁶² Le complexe ETS1-2/CBP/p300 reconnaît deux sites EBS situés en tandem dans le promoteur proximal du gène de la stromelysine-1 (ou *MMP-3*).¹⁶³ L'activité histone-acétyl(e) transférase médiée par CBP/p300 permet d'activer la transcription de la

stromelysine-1. Le promoteur de la stromelysine-1 est également reconnu par le facteur de transcription ETV6 (*Tableau X*).¹⁵³ ETV6 réprime l'activité du promoteur de la stromelysine-1 via les mêmes sites EBS que ceux reconnus par les activateurs transcriptionnels ETS1 et ETS2. La présence d'ETV6 sur le promoteur de la stromelysine-1/*MMP-3* pourrait nuire au recrutement du complexe ETS1-2/CBP/p300 sur le promoteur proximal de la stromelysine-1, ce qui serait défavorable à son activité transcriptionnelle. De plus, le répresseur transcriptionnel ETV6 peut recruter le complexe protéique N-CoR/mSin3a/SMRT ainsi que les histones déacétylases HDAC3 et HDAC9 sur son promoteur cible.¹¹⁹⁻¹²² La déacétylation des histones entraînerait alors la fermeture de la chromatine, ce qui serait nuisible à l'activation transcriptionnelle du promoteur proximal de la stromelysine-1.

Dans mon projet, la délétion des promoteurs étudiés a permis d'identifier une région près du promoteur proximal suffisante à la répression transcriptionnelle médiée par ETV6 : *TP53-P1* (-250 à +80), *TP53-P2* (+14 à +290), *SPHK1* (-168 à +115), *IL-18* (-174 à +79), *PTGER4* (-337 à +178) et *LUM* (-411 à +332). Le répresseur transcriptionnel ETV6 requiert donc une région régulatrice située près du promoteur de base pour réprimer la transcription de son gène cible. Ceci a également été observé chez d'autres cibles transcriptionnelles de ETV6. ETV6 régule la transcription du gène *Bcl-X_L* en reconnaissant une région située près de son promoteur de base.¹⁵⁴ Cette étude a été réalisée dans les cellules de fibroblastes embryonnaires murins NIH3T3, où la surexpression de ETV6 augmente le niveau d'apoptose des cellules NIH3T3. Cette réponse pro-apoptotique est favorisée par la diminution de l'expression de la protéine anti-

apoptotique *Bcl-X_L*. Une étude distincte montre également que l'activité du promoteur du gène *Bcl-X_L* augmente lorsque des activateurs transcriptionnels de la famille Ets (ETS1, ETS2 et PU.1) sont surexprimés dans des cellules humaines de mésothéliome I45.¹⁶⁴ Ainsi, les études de régulation transcriptionnelle sur les promoteurs des gènes de la stromelysine-1 et de *Bcl-X_L* mettent en évidence que les cibles transcriptionnelles du répresseur transcriptionnel ETV6 peuvent être partagées entre les membres de la famille Ets (Figure 30).

Le facteur de transcription FLI-1, un membre de la famille Ets, est un régulateur positif de la transcription des gènes *GPIb α* et *GPIX*.¹³⁰ La présence de ETV6 inhibe la réponse transcriptionnelle médiée par FLI-1 sur le promoteur proximal des gènes *GPIb α* et *GPIX*. Il est intéressant de noter que ETV6 seul peut réprimer la transcription du gène *GPIX*, mais pas celle du gène *GPIb α* . Cette situation est similaire à celle du gène *MCSFR* dont l'activation du promoteur proximal par les facteurs de transcription AML1b et C/EBP α est inhibée par la présence de ETV6.¹⁵⁵ Ces études suggèrent donc que ETV6 peut agir à titre de co-facteur transcriptionnel.

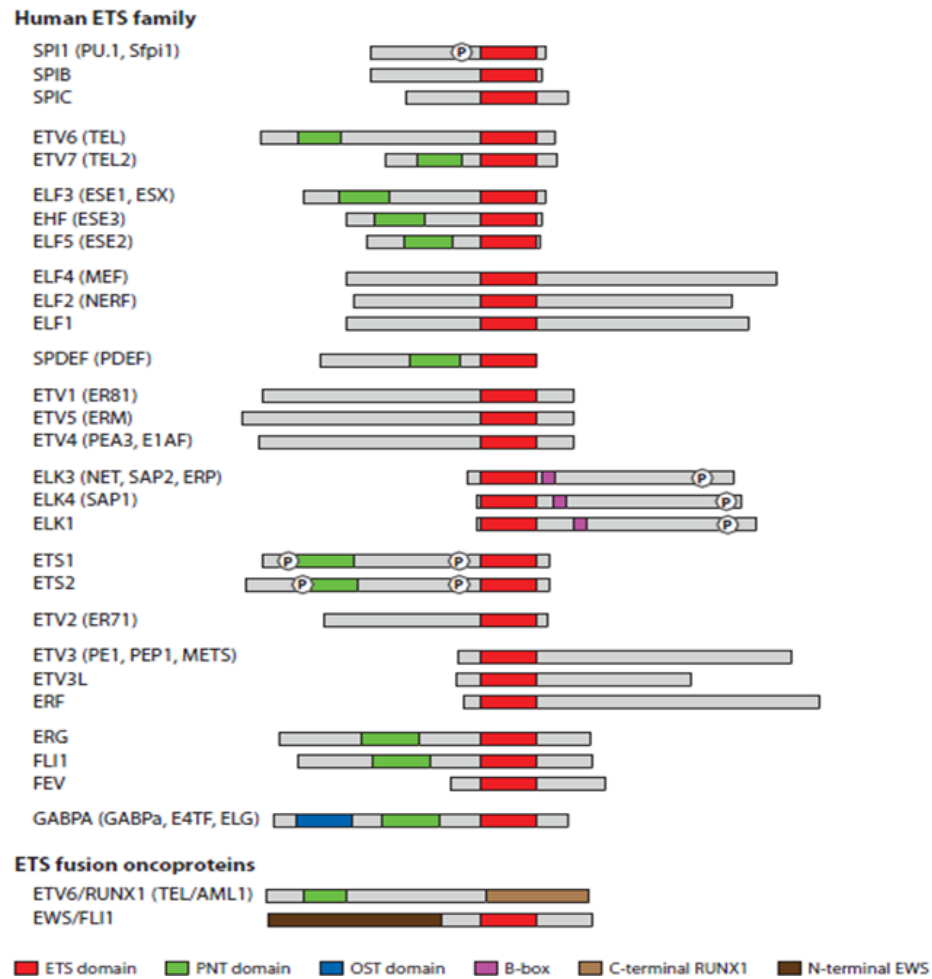


Figure 30. Les facteurs de transcription de la famille Ets. Les domaines fonctionnels des 29 membres sont indiqués, ainsi que les sites de phosphorylation (P encerclé). Cette figure est tirée de Hollenhorst PC et al.¹⁶⁵

4.2.3. Les domaines PNT et ETS sont requis lors de la répression transcriptionnelle des nouvelles cibles de ETV6.

Nos essais luciférase démontrent que les domaines PNT et ETS d'ETV6 sont impliqués dans la répression de l'activité des promoteurs de *TP53* (classique et alternatif), *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* et *LUM*. Le domaine PNT est responsable de l'homodimérisation du facteur de transcription ETV6.^{129,166,167} La lysine 99 du domaine PNT est impliquée dans la localisation nucléaire du répresseur transcriptionnel.¹⁶⁸ La sumyolation de la lysine 99 par la protéine UBC9 entraînerait la relocalisation d'ETV6 dans le cytoplasme, particulièrement lorsque la cellule est exposée à des conditions de stress.^{141,143} La perte du domaine fonctionnel PNT devrait donc favoriser la location nucléaire du facteur de transcription ETV6.¹⁶⁷

La forme monomérique de ETV6 possède une affinité faible pour son site de liaison à l'ADN, un mécanisme moléculaire expliqué par le positionnement d'une hélice adjacente devant le domaine fonctionnel ETS.¹⁶⁹ Ceci cause le blocage stérique du domaine fonctionnel ETS. La dimérisation de ETV6 via le domaine fonctionnel PNT favorise l'exposition du domaine ETS et, conséquemment, la reconnaissance d'un site EBS consensus. Le domaine de liaison à l'ADN ETS est présent chez les 29 membres de la famille Ets. Il est responsable de la reconnaissance d'un site EBS consensus sur l'ADN de type « purines-GGAA/T-purines ». Le domaine ETS est également impliqué dans la localisation nucléaire du répresseur transcriptionnel ETV6.¹⁷⁰ Ainsi, la présence des deux domaines fonctionnels (PNT et ETS) est importante lors de la liaison à l'ADN du facteur de transcription ETV6. Dans un tel contexte, les protéines ETV6 Δ PNT et ETV6 Δ ETS que nous avons utilisé ne peuvent pas réprimer la transcription de *TP53-P1*, *TP53-*

P2 et *LUM*. Toutefois, la répression transcriptionnelle du promoteur de *SPHK1*, *IL-18* et *PTGER4* n'est pas complètement abolie par l'absence du domaine fonctionnel PNT ou ETS. Ceci suggère que le domaine central de répression du facteur de transcription ETV6 influencerait davantage la régulation transcriptionnelle des gènes *SPHK1*, *IL-18* et *PTGER4* par rapport aux autres gènes étudiés. Ce domaine peut interagir avec le co-répresseur de transcription N-CoR, qui permet de recruter les protéines SMRT et les histones déacétylase 3 et 9 (HDAC3/HDAC9).¹²⁰⁻¹²² HDAC3 et HDAC9 entraînent la fermeture de la chromatine via le repositionnement stable des nucléosomes, ce qui nuira au recrutement de la machinerie transcriptionnelle. La protéine mSin3A peut également lier le domaine central de répression et contribuer au recrutement des histones déacétylases. La capacité du facteur de transcription ETV6 à remodeler la chromatine via le complexe mSin3A/N-CoR/SMRT/HDACs n'implique pas son domaine fonctionnel PNT. Ceci a été montré par l'entremise d'essais de gène rapporteur avec un inhibiteur spécifique aux histones déacétylases de la classe I, comme HDAC3. Cet inhibiteur ne modifiait pas le niveau de répression transcriptionnelle médiée par le domaine fonctionnel PNT de ETV6.¹²¹

4.2.4. La répression transcriptionnelle médiée par ETV6 implique des séquences consensus EBS.

Les essais luciférase avec les constructions tronquées de ETV6, soit ETV6 Δ PNT et ETV6 Δ ETS, suggèrent que des sites EBS consensus participent à la régulation transcriptionnelle médiée par ETV6. Les deux domaines fonctionnels de ETV6 (PNT et ETS) assurent l'homodimérisation de ETV6, ce qui augmente grandement

son affinité pour l'ADN.¹⁶⁸ Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de modifier les sites EBS consensus pour ensuite en mesurer l'impact sur les six promoteurs étudiés.

La région -411 à +332 du promoteur proximal de *LUM* contient 4 sites EBS : EBS -152, EBS -126, EBS +13 et EBS +277. Dans les cellules Jurkat, la perte simultanée des sites EBS -152 et EBS +277 abolit la répression transcriptionnelle médiée par ETV6 sur le promoteur proximal de *LUM*. Une étude sur le promoteur murin de *LUM* suggère que le site EBS -126 serait reconnu par l'activateur transcriptionnel ETS2.¹⁷¹ Les sites EBS du promoteur proximal du gène *LUM* pourraient donc être reconnus par plusieurs facteurs Ets dont ETV6 et ETS2. Ainsi, selon le contexte cellulaire, ETV6 régule l'activité du promoteur de *LUM* de façon EBS-dépendante.

La région -250 à +80 du promoteur classique de *TP53* contient trois sites EBS dispersés sur une région de 20 paires de base : EBS -90, EBS -80 et EBS -77. Les essais luciférase dans les cellules HeLa illustrent l'implication de chaque EBS du promoteur classique de *TP53* dans la répression transcriptionnelle médiée par ETV6. Chez les cellules Jurkat, la mutation des sites EBS ne modifie pas l'efficacité de la répression transcriptionnelle médiée par ETV6 sur le promoteur classique de *TP53*. Ainsi, dépendamment du contexte cellulaire, le regroupement de trois sites EBS -90/-80/-77 est essentiel à la répression transcriptionnelle du gène *TP53* médiée par ETV6. L'activité du promoteur classique de *TP53* peut également être régulée par les activateurs transcriptionnels ETS1 et ETS2, deux membres de la famille Ets. ETS1 et ETS2 reconnaissent deux sites EBS consensus différents, soit EBS -335 et EBS -324.^{172,173} Des études sur le

développement hématopoïétique murin montrent que les facteurs de transcription ETV6, ETS1 et ETS2 sont co-exprimés chez les lymphocytes B progéniteurs, précurseurs et matures.⁸ Puisque ces trois facteurs de transcription régulent l'activité transcriptionnelle du promoteur de *LUM* et du promoteur classique de *TP53*, ceci suggère que les facteurs de transcription de la famille Ets partagent certaines cibles transcriptionnelles. Ceci est également le cas pour le promoteur de la *MMP-3* et de *Bcl-X_L*, tel que mentionné précédemment (*section 4.2.2.*).^{153,154} Lors du développement de la LLA pré-B pédiatrique, l'inactivation du facteur de transcription ETV6 pourrait favoriser la régulation transcriptionnelle du promoteur de *LUM* et du promoteur classique de *TP53* par d'autres facteurs de transcription de la famille Ets. Pour ces promoteurs, la régulation transcriptionnelle médiée par ETV6 dépend à la fois du contexte cellulaire et de la présence de sites EBS consensus (Figure 31, modèle A).

La région +14 à +290 du promoteur alternatif de *TP53* contient 4 sites EBS consensus : EBS +155, EBS +195, EBS +246 et EBS +252. Les essais luciférase dans les cellules HeLa et Jurkat confirment qu'aucun de ces EBS n'est reconnu par ETV6. ETV6 ne requiert donc pas la présence de sites EBS consensus pour réguler la transcription de certains gènes, dont l'isoforme $\Delta 133p53$. Certaines études proposent que ETV6 peut agir comme co-facteur transcriptionnel. Par exemple, le facteur de transcription STAT3 peut recruter le répresseur transcriptionnel ETV6 via son domaine fonctionnel PNT.¹³⁵ STAT3 maintient alors sa capacité de lier l'ADN de ses promoteurs cibles, mais le recrutement de ETV6 entraîne une répression transcriptionnelle. Le recrutement du répresseur transcriptionnel ETV6 sur un élément de régulation transcriptionnelle peut donc

être accompli par l'intermédiaire d'un autre facteur de transcription (Figure 31, modèle B).

La région -168 à +115 du promoteur proximal de *SPHK1* contient 4 sites EBS : EBS -158, EBS -104, EBS -84 et EBS +61. Les essais luciférasés dans les cellules HeLa montrent que le site EBS -158, EBS -104 et EBS +61 sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle médiée par ETV6. La région -174 à +79 du promoteur proximal de *IL-18* renferme 4 sites EBS : EBS -157, EBS -79, EBS -3 et EBS +61. La perte des sites EBS -157, EBS -79 et EBS -3 ensemble réduit grandement l'efficacité de la répression transcriptionnelle médiée par ETV6, sans toutefois l'abolir. La région -337 à +178 du promoteur proximal de *PTGER4* contient 6 sites EBS : EBS -335, EBS -97, EBS -92, EBS -55, EBS -49 et EBS +35. Chez les cellules HeLa, la mutation simultanée des EBS -97/-92 ou EBS -55/-49 diminue la répression transcriptionnelle médiée par ETV6 sur le promoteur de *PTGER4*. Le facteur de transcription ETV6 peut donc reconnaître des EBS consensus pour réprimer la transcription des gènes *SPHK1*, *IL-18* et *PTGER4*, mais d'autres mécanismes moléculaires seront nécessaires (Figure 31, modèle C).

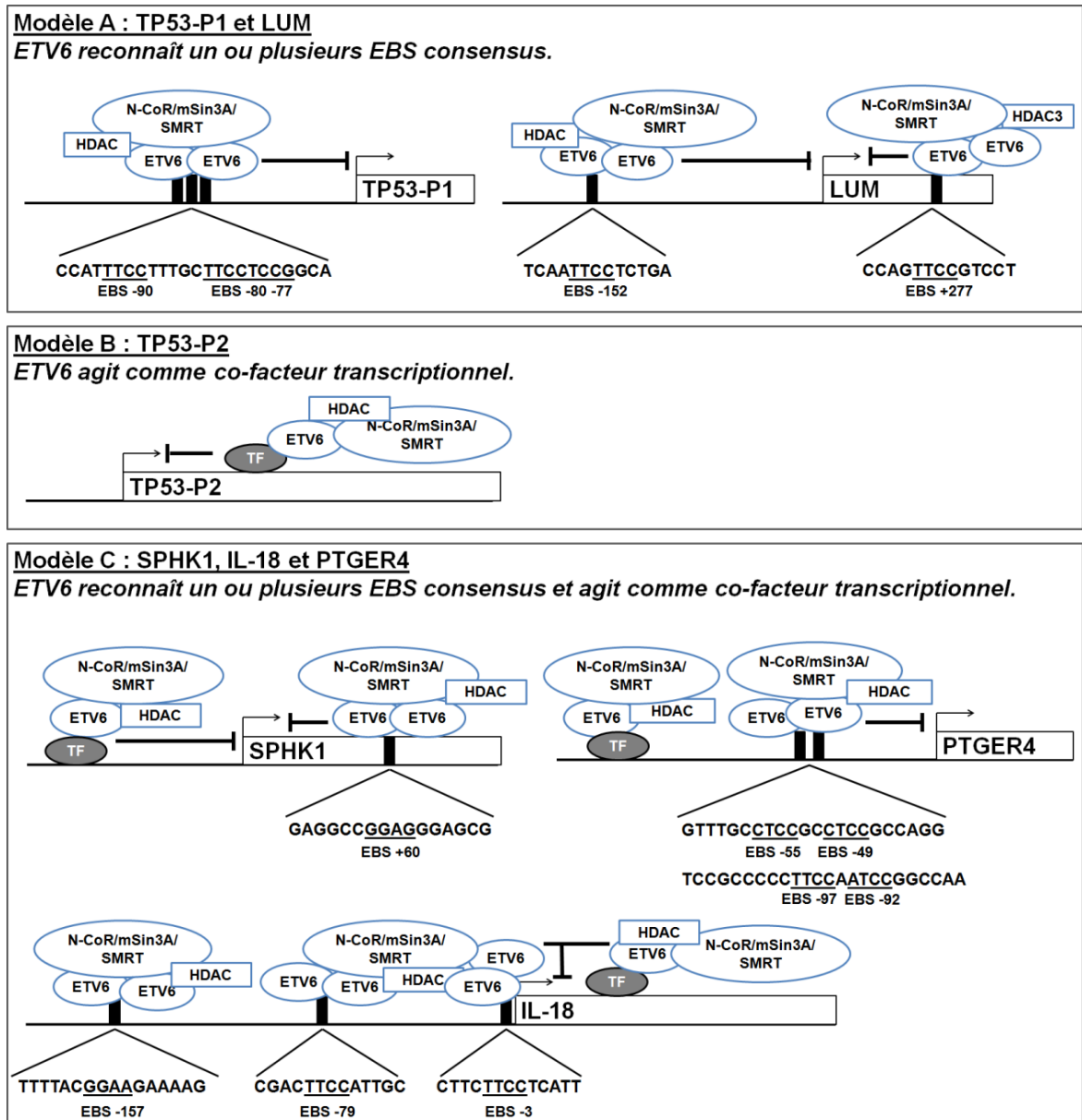


Figure 31. Modèles de régulation transcriptionnelle par ETV6. (Modèle A) Le répresseur transcriptionnel ETV6 lie un ou plusieurs sites EBS consensus. Ceci est essentiel à la répression transcriptionnelle du promoteur classique de *TP53*, ainsi que du promoteur de *LUM*. Ce mécanisme moléculaire peut dépendre du contexte cellulaire. **(Modèle B)** ETV6 est recruté au promoteur alternatif de *TP53*, mais il ne peut pas cibler un EBS consensus pour réprimer la transcription. ETV6 pourrait donc agir comme co-facteur transcriptionnel lors de la régulation transcriptionnelle de l'isoforme $\Delta 133p53$. **(Modèle C)**. Les EBS consensus sont reconnus par ETV6, car leur absence diminue l'efficacité de la répression transcriptionnelle. Par contre, contrairement au modèle A, d'autres mécanismes moléculaires entrent en jeu. Il

serait peu probable qu'ETV6 reconnaisse un site consensus différent du EBS, mais ETV6 pourrait être recruté au promoteur proximal de *SPHK1*, *IL-18* et *PTGER4* comme co-facteur transcriptionnel. EBS : Ets-Binding site et la position par rapport au site d'initiation de la transcription (=+1). TF: facteur de transcription

4.3. Les cibles transcriptionnelles de ETV6 et la leucémogénèse pédiatrique.

4.3.1. ETV6 influence la réponse biologique.

Le facteur de transcription ETV6 est essentiel durant l'hématopoïèse et favorise l'entrée en apoptose dans différents modèles cellulaires (*section 1.6.4.*). ETV6 agirait comme un gène suppresseur de tumeur durant le développement de la LLA pré-B pédiatrique. Par contre, très peu d'études se sont penchées sur le rôle des cibles transcriptionnelles de ETV6 durant le développement tumoral. Il est donc important de vérifier l'impact des cibles transcriptionnelles d'ETV6 dans un modèle cellulaire qui se rapproche de la LLA pré-B de l'enfant.

Pour comprendre le rôle des cibles transcriptionnelles de ETV6 durant la leucémogénèse pédiatrique, nous avons réalisé des études fonctionnelles dans les cellules Reh. Celle-ci sont dérivées de lymphocytes pré-B leucémiques d'un enfant porteur de la translocation t(12;21) et présentant une délétion de l'allèle ETV6 résiduel. La LLA pré-B pédiatrique est caractérisée par une prolifération massive et rapide des cellules leucémiques (prolifération cellulaire) dans la moelle osseuse (migration médiée par la voie de signalisation CXCL12/CXCR4). Ces lymphocytes pré-B leucémiques possèdent un avantage de survie par rapport aux autres cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse (apoptose). Nous avons donc plus spécifiquement étudié trois phénotypes moléculaires: la prolifération cellulaire, l'apoptose induite par un stress génotoxique et la migration cellulaire médiée par la voie de signalisation CXCL12/CXCR4. Pour la suite du texte, les cellules Reh seront référées comme des cellules leucémiques.

4.3.2. Les isoformes du gène *TP53*.

Dans notre étude, les 26 enfants étudiés atteints de la LLA pré-B, ne possédaient aucune mutation inactivatrice dans la séquence codante pour p53, ce qui est fréquent dans les tumeurs hématologiques.^{158,174} Tous les patients leucémiques (26/26) exprimaient les transcrits p53 α et p53 β , alors que la majorité des patients exprimait le transcrit p53 γ (19/26). Les isoformes p53 α et p53 β étaient également présents dans la moelle osseuse des individus contrôles (7/7), tout comme p53 γ (3/7). Cette étude n'a donc pas constaté de différences au niveau de l'expression des transcrits p53 α , p53 β et p53 γ entre les patients leucémiques et les individus contrôles. Ceci a été vérifié par un test exact de Fisher. Les transcrits p53 α , p53 β et p53 γ sont responsables de l'expression de six protéines : p53 α , p53 β , p53 γ , $\Delta 40p53\alpha$, $\Delta 40p53\beta$ et $\Delta 40p53\gamma$. Le rôle de p53 α comme gène suppresseur de tumeur est bien connu, mais ses isoformes p53 β et p53 γ ne peuvent pas induire la réponse apoptotique ou réguler la transcription des cibles transcriptionnelles médiée par p53 α .¹⁷⁵ La présence de p53 β favoriserait l'entrée en sénescence cellulaire répllicative, un mécanisme protecteur contre le développement tumoral.¹⁷⁶ Chez les isoformes $\Delta 40p53$, le rôle de $\Delta 40p53\alpha$ a été associé au maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires. $\Delta 40p53\alpha$ modulerait l'activité transcriptionnelle médiée par p53 α sur les gènes Nanog et le récepteur IGF-1, ce qui assurerait un contrôle fin durant la transition de pluripotence à différenciation cellulaire.¹⁷⁷ Ainsi, les isoformes de p53 α et $\Delta 40p53\alpha$ peuvent jouer un rôle dans la transition pluripotence vers différenciation cellulaire.

Les isoformes $\Delta 133P53$ sont transcrits à partir du promoteur alternatif de TP53 (P2), présent dans l'intron 4 du locus TP53.¹⁵⁶ De façon similaire à l'isoforme

p53, le transcrit $\Delta 133p53$ subit un épissage alternatif pour former les transcrits $\Delta 133p53\alpha$, $\Delta 133p53\beta$ et $\Delta 133p53\gamma$. Ces derniers seront traduits en six protéines: $\Delta 133p53\alpha$, $\Delta 133p53\beta$, $\Delta 133p53\gamma$, $\Delta 160p53\alpha$, $\Delta 160p53\beta$ et $\Delta 160p53\gamma$.^{156,178} Plusieurs études proposent actuellement le rôle d'oncogène aux isoformes $\Delta 133p53$. Dans un modèle murin, l'expression de $\Delta 133p53$ favorisait le développement d'un lymphome B diffus à grande cellule et ce peu importe le statut de p53.¹⁵⁷ Dans notre étude, la majorité des enfants atteints de la LLA pré-B exprimaient le transcrit $\Delta 133p53\alpha$ (24/26). D'ailleurs, un test exact de Fisher a permis de proposer que le transcrit $\Delta 133p53\alpha$ est davantage présent chez les enfants atteints de la LLA pré-B (24/26) que chez des individus contrôles (3/7). Nous n'avons pas noté de différence au niveau du statut d'expression du transcrit $\Delta 133p53\beta$ ou $\Delta 133p53\gamma$ entre les enfants atteints de la LLA pré-B (18/26 ou 3/26) et les individus contrôles (3/7 ou 0/7). Étant donné le rôle possible de $\Delta 133p53$ comme oncogène, nous pouvons envisager que les enfants atteints de la LLA pré-B présenteraient une surexpression des isoformes $\Delta 133p53$. Le rôle des isoformes de *TP53* dans la LLA pré-B pédiatrique et leur expression chez les patients seront explorés davantage lorsque des anticorps spécifiques à chacun des isoformes de p53 seront disponibles. De plus, l'expression plus fréquente du transcrit $\Delta 133p53\alpha$ chez la LLA pré-B pédiatrique devra être confirmée dans une cohorte de patients plus large.

4.3.3. Lumican et l'oncogénèse.

Les études phénotypiques dans les cellules leucémiques n'ont pas permis de comprendre le rôle de LUM dans le développement de la LLA pré-B de l'enfant.

L'expression de lumican n'a pas été détectée au niveau protéique dans les lymphocytes pré-B leucémiques, même si son ARNm était détectable par PCR quantitatif. Il est probable que les cellules leucémiques ne puissent pas synthétiser une protéine fonctionnelle de lumican, ou que la stabilité de la protéine soit très faible dans des conditions de culture cellulaire.

Le rôle de lumican a davantage été étudié dans des contextes physiologiques. Des expériences d'immunohistochimie sur des tissus de cancer du sein montrent une surexpression des niveaux protéiques de lumican.^{179,180} Les cellules cancéreuses d'un adénocarcinome pulmonaire présentaient également une expression élevée de lumican au niveau intracellulaire et en périphérie de la cellule cancéreuse.¹⁸¹ Chez les cellules murines d'un adénocarcinome pancréatique, la surexpression de lumican favorise la prolifération cellulaire.¹⁸² Lumican a également été impliqué dans la migration cellulaire. Par exemple, en présence des intégrines $\alpha 2$ et $\beta 1$, lumican inhibe la migration des cellules de mélanome humain A375.¹⁸³ LUM peut donc moduler des voies biologiques dérégulées durant l'oncogenèse comme la prolifération et migration cellulaire. Pour comprendre le rôle de lumican durant la leucémogénèse pédiatrique, il serait avantageux de tirer profit d'un modèle murin qui répliquera fidèlement la LLA pré-B pédiatrique. Malgré tous les efforts de la communauté scientifique, un modèle murin du sous-type génétique (12;21) ETV6-AML1 de la LLA pré-B pédiatrique n'est pas encore disponible.

4.3.4. SPHK1 et PTGER4 augmentent le taux de prolifération des cellules leucémiques.

La sphingosine kinase 1 (SPHK1) catalyse la phosphorylation de la sphingosine en sphingosine-1-phosphate (S1P). S1P est impliqué dans la régulation de plusieurs voies biologiques dont la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation cellulaire, la migration des lymphocytes, le maintien de l'intégrité vasculaire et la production de cytokines et de chimiokines.¹⁸⁴ L'expression de SPHK1 et son activité enzymatique sont favorables à la prolifération des cellules cancéreuses du sein MCF-7.¹⁸⁵ Une forte expression de SPHK1 diminue l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques de l'adénocarcinome de la prostate.¹⁸⁶ Finalement, des souris transgéniques Spi-1/PU.1 présenteront une surexpression de SPHK1 lors du développement de l'érythroleucémie.¹⁸⁷ Ces évidences scientifiques nous portent donc à croire que SPHK1 pourrait être impliqué dans la LLA pré-B pédiatrique.

Nous avons démontré que la diminution de l'expression de SPHK1, qui peut résulter de l'expression d'ETV6 dans les lymphocytes pré-B leucémiques¹⁴⁹, entraîne une légère augmentation de la prolifération cellulaire. Une autre étude réalisée dans des cellules humaines WRO, SW579 et FRO issues de tumeurs de la thyroïde confirme le rôle de SPHK1 dans la prolifération cellulaire.¹⁸⁸ Une diminution des niveaux protéiques de SPHK1 ralentit également la prolifération des cellules humaines cancéreuses gastriques MKN28 et N87.¹⁸⁹ SPHK1 agit comme régulateur positif de la prolifération des cellules épithéliales de polypes intestinaux, ce qui entraîne une augmentation de leur taille.¹⁹⁰ La réponse androgène du cancer de la prostate ainsi que la réponse œstrogène du cancer de sein sont

également affectées par le niveau d'expression de SPHK1.^{191,192} Ainsi, l'expression de SPHK1 et son activité enzymatique favorisent le développement tumoral dans plusieurs contextes physiologiques différents. Notre étude montre maintenant qu'une augmentation de l'expression de SPHK1 favorise la prolifération des lymphocytes pré-B leucémiques.

PTGER4 est un récepteur transmembranaire couplé aux protéines G_s. Son ligand principal est la prostaglandine E₂ (PGE₂), synthétisé par les enzymes COX1 et COX2 à partir de l'acide arachidonique. Nous avons démontré qu'une diminution de l'expression de PTGER4 dans les cellules leucémiques était défavorable à la prolifération cellulaire. Cette étude est la première à proposer un rôle de PTGER4 dans le développement de la LLA pré-B pédiatrique. PTGER4 favorise la prolifération des cellules cancéreuses de l'adénocarcinome de l'endomètre, surtout dans des conditions hypoxiques.¹⁹³ Ce phénotype a été confirmé par une augmentation du volume de la tumeur chez la souris lorsque PTGER4 est surexprimé. Les cellules cancéreuses peuvent maintenir leurs mécanismes de prolifération dans un microenvironnement pauvre en nutriments ou en oxygène. D'ailleurs, des modèles murins de la LLA pré-B proposent la localisation des cellules souches leucémiques dans les niches hypoxiques de la moelle osseuse.¹⁹⁴ Dans un milieu de culture qui n'est pas renouvelé quotidiennement et qui s'appauvrit en nutriments, nous avons démontré que les cellules leucémiques maintiennent leur prolifération, alors qu'une diminution de l'expression de PTGER4 ralentit considérablement leur prolifération. Pour compléter ce résultat, les cellules leucémiques ont été exposées à un antagoniste spécifique de PTGER4, nommé L-161982, qui bloque la production d'AMPc

normalement induite par l'activation de la protéine G_s couplée au récepteur PTGER4.¹⁹⁵ Une exposition à l'antagoniste L-161982 ralentit considérablement la prolifération des cellules leucémiques. L'inhibition du récepteur transmembranaire PTGER4 défavorise donc la prolifération des cellules leucémiques.

La voie de signalisation PGE_2 /PTGER4 est impliquée dans l'activation du récepteur transmembranaire EGF au cours du développement tumoral gastrique.¹⁹⁶ Cette étude démontre que l'inhibition de la voie PGE_2 /PTGER4 entraîne un arrêt de l'activation du récepteur EGF par ses ligands, ce qui est défavorable à la prolifération cellulaire. Lorsque des cellules CT26 sont injectées chez la souris, l'activation du récepteur transmembranaire PTGER4 par son ligand PGE_2 favorise le développement tumoral du cancer du colon.¹⁹⁷ Dans le contexte pathologique du lymphome B, un modèle murin de la maladie suggère que l'activation de la voie de signalisation PGE_2 /PTGER4 inhibe la prolifération tumorale.¹⁹⁸ Ceci serait le résultat d'une rétroaction négative qui empêcherait l'activation du récepteur transmembranaire BCR par des antigènes étrangers. Chez les cellules leucémiques, nous avons démontré que l'ajout de PGE_2 dans le milieu de culture diminuait le taux de prolifération cellulaire. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes qui montrent une inhibition de la synthèse de l'ADN dans les cellules leucémiques exposées au PGE_2 .¹⁹⁹ Ceci est accompli par une activation de la voie AMPc par la protéine G_s , et éventuellement une inhibition des kinases ERK1 et ERK2.²⁰⁰ L'ajout de PGE_2 ayant un effet négatif sur la prolifération des cellules leucémiques, il est possible d'envisager que le ligand PGE_2 régule l'activité des autres membres de la famille PTGER. D'ailleurs, les récepteurs PTGER1-2-3-4 sont exprimés par les cellules leucémiques de

patients.²⁰¹ Il est donc possible que l'activation du récepteur transmembranaire PTGER4 dans les lymphocytes pré-B leucémiques se fasse par un autre ligand.

4.3.5. IL-18 favorise l'entrée en apoptose des lymphocytes pré-B leucémiques suite à un stress génotoxique.

L'interleukine-18 (IL-18) est une cytokine pro-inflammatoire de la famille de ligand IL-1 impliquée dans la réponse immunitaire humorale.²⁰² De façon similaire à IL-1 β , IL-18 est d'abord exprimé sous la forme d'un précurseur qui sera clivé par la caspase-1 du complexe de l'inflammasome. L'activité biologique de IL-18 est gouvernée par sa liaison à son complexe de récepteur, composé des sous-unités IL-18R α et IL18-R β .²⁰³ Chez les cellules Th1, l'interaction entre IL-18 et son complexe de récepteurs stimule la synthèse de la cytokine pro-inflammatoire IFN- γ .²⁰² IL-18 a été associé à plusieurs contextes pathologiques que ce soit au niveau des maladies inflammatoires²⁰⁴ ou des tumeurs solides.²⁰⁵ Même si l'expression de IL-18 est modulée par le facteur de transcription ETV6 chez les enfants atteints de la LLA pré-B, son rôle dans la leucémogénèse pédiatrique est inconnu.¹⁴⁹ Nous avons démontré que la modulation de l'expression de IL-18 dans les cellules leucémiques n'influence pas leur taux de prolifération.

Le rôle de l'interleukine-18 a été rapporté à travers différents contextes cellulaires. Par exemple, IL-18 joue un rôle positif dans la prolifération des cellules « natural killer ». ²⁰⁶ Dans le contexte pathologique du cancer du colon, IL-18 ralentit la prolifération cellulaire via une modulation de l'expression de facteurs mitogéniques et de cytokines inflammatoires.²⁰⁷ La liaison de IL-18 à son complexe de récepteur entraîne l'activation de deux voies signalétiques: la voie

IRAK/TRAF6²⁰⁸ et la voie MAPK.²⁰⁹ L'activation de la voie signalétique IRAK/TRAF6 favorise la prolifération cellulaire, tandis que la voie MAPK n'influence pas la prolifération cellulaire. Puisque la prolifération des cellules leucémiques n'est pas influencée par l'interleukine-18, il est probable que celle-ci n'active pas la voie IRAK/TRAF6. Ainsi, dans le contexte de la leucémogénèse pédiatrique, l'interleukine-18 n'influence pas le taux de prolifération cellulaire.

Dans notre étude, IL-18 seule ne modifie pas le niveau d'apoptose ou de nécrose dans les cellules leucémiques. Par contre, suite à un stress génotoxique (ex. traitement à la camptothécine), une surexpression de IL-18 dans les cellules leucémiques favorise l'induction de l'apoptose. Même si cette augmentation de la réponse apoptotique reste modérée, ceci suggère que IL-18 peut moduler la voie intrinsèque de l'apoptose dans les cellules leucémiques. Le rôle de IL-18 dans l'activation de la voie intrinsèque ou extrinsèque de l'apoptose a été caractérisé de façon détaillée dans les cellules endothéliales HCMEC.²¹⁰ IL-18 entraîne une surexpression du récepteur Fas et de son ligand FasL, ainsi qu'une diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L. IL-18 entraîne également la surexpression du ligand FasL chez les cellules « natural killer ».²¹¹ Ceci augmente le potentiel de destruction de la cellule « natural killer » par la reconnaissance du récepteur Fas sur une cellule exprimant le ligand FasL (ex. une cellule infectée par un virus, une cellule tumorale, etc). Ainsi, la surexpression de IL-18 par la cellule leucémique pourrait nuire à la prolifération des autres cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse. L'espace disponible dans la moelle osseuse augmenterait, ce qui serait favorable à la prolifération massive des cellules leucémiques.

4.3.6. SPHK1 et PTGER4 inhibent l'entrée en apoptose des lymphocytes pré-B leucémiques suite à un stress génotoxique.

Un traitement à la camptothécine permet d'induire la formation de bris d'ADN double-brin dans la chromatine. Face à la perte de l'intégrité du génome cellulaire, une cellule normale activera ses mécanismes d'apoptose pour induire son suicide. Par contre, une cellule cancéreuse aura développé une résistance à l'apoptose pour favoriser sa survie dans des conditions de stress.

Dans notre étude, nous avons montré qu'une diminution du niveau de l'expression de SPHK1 est favorable à l'entrée en apoptose des cellules leucémiques. La sphingosine kinase 1 agit donc comme un régulateur négatif de l'apoptose chez les cellules leucémiques. Dans des cellules cancéreuses de l'adénocarcinome de la prostate, l'inhibition sélective de l'activité enzymatique de SPHK1 entraîne une diminution de la production de sphingosine-1-phosphate, ce qui active la voie apoptotique caspase-dépendante.²¹² Des études sur les cellules leucémiques U937 et Jurkat proposent un rôle anti-apoptotique pour SPHK1 dans la leucémogénèse via le développement d'inhibiteurs spécifiques ciblant l'activité enzymatique de SPHK1.²¹³ La surexpression de SPHK1 chez la cellule leucémique serait donc favorable à sa survie dans une situation de stress génotoxique.

Un traitement à la camptothécine de 24-48 heures augmente les niveaux protéiques de SPHK1 dans les cellules cancéreuses de la prostate PC3.²¹⁴ Une exposition prolongée à la doxorubicine (24-48 heures), un autre inhibiteur de l'ADN topoisomérase II, entraîne une augmentation de l'expression de SPHK1 dans les cellules U937 et Jurkat.²¹⁵ La synthèse de S1P est augmentée et relâchée dans le milieu extracellulaire où il servirait de chimioattractant pour les monocytes, ce qui

favoriserait l'élimination de la cellule apoptotique. Ainsi, la sphingosine-1-phosphate produit par SPHK1 inhibe le déclenchement de l'apoptose caspase-dépendante, mais favorise l'élimination propre de la cellule ayant enclenché son processus apoptotique. Dans le contexte expérimental de notre étude, la durée d'exposition à la camptothécine était de 4 heures. Par rapport aux études mentionnées, ceci est insuffisant pour entraîner un changement au niveau protéique de SPHK1.

Notre étude a également permis d'étudier l'entrée en apoptose des cellules leucémiques présentant des niveaux d'expression variables de PTGER4. Une diminution de l'expression du récepteur transmembranaire PTGER4 chez le lymphocyte pré-B leucémique favorise son entrée en apoptose suite à un stress génotoxique. Ceci est la première étude qui démontre le rôle de PTGER4 dans la régulation de la réponse apoptotique des cellules leucémiques. Dans d'autres modèles leucémiques comme les cellules Jurkat, l'activation de la voie de signalisation PGE₂/PTGER4 entraîne une diminution du clivage de la caspase 3, ce qui ne favorise pas l'entrée en apoptose.²¹⁶ Le rôle anti-apoptotique de PTGER4 a également été observé chez les macrophages d'un modèle murin de l'athérosclérose, où l'absence de PTGER4 augmente la sensibilité à l'apoptose via une suppression de la voie PI3K/Akt et NF-κB.²¹⁷ Le récepteur transmembranaire PTGER4 permettrait donc de diminuer l'entrée en apoptose des cellules leucémiques, ce qui serait favorable à la survie du lymphocyte pré-B leucémique dans la moelle osseuse.

4.3.7. SPHK1, IL-18 et PTGER4 favorisent la migration des lymphocytes pré-B leucémiques par la voie CXCL12/CXCR4.

La voie signalétique CXCL12/CXCR4 est essentielle à la domiciliation (homing) des cellules souches hématopoïétiques CD34+ dans la moelle osseuse.²¹⁸ Les cellules leucémiques expriment le récepteur transmembranaire CXCR4.^{219,220} Lorsque la voie signalétique CXCL12/CXCR4 est inhibée par un antagoniste spécifique, il y a une forte mobilisation des cellules leucémiques dans la circulation périphérique.²²¹ Puisque les cellules leucémiques sont sensibles à la migration cellulaire induite par l'activation de la voie signalétique CXCL12/CXCR4²²⁰, nous avons étudié le rôle de SPHK1, IL-18 et PTGER4 dans la modulation de leur migration cellulaire.

Nous avons démontré que l'expression de SPHK1 est favorable à la migration des lymphocytes pré-B leucémiques. Cet effet de SPHK1 sur la migration cellulaire médiée par la voie de signalétique CXCL12/CXCR4 est sûrement attribuable à une augmentation de la production de sphingosine-1-phosphate (S1P). Le S1P favorise l'invasion des cellules murines hématopoïétiques primitives vers les cellules stromales.²²² Cet effet a été validé chez des cellules souches hématopoïétiques humaines.²²³ Ainsi, une production accrue de S1P par les cellules leucémiques favoriserait leur domiciliation ou rétention dans la moelle osseuse. D'ailleurs, le récepteur transmembranaire S1P₁, reconnu par la S1P, a été impliqué dans la réponse CXCR4. Suite à une inhibition spécifique du récepteur CXCR4 par l'antagoniste AMD3100, les souris transgéniques S1P₁^{-/-} sont moins sensibles à la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques vers la circulation périphérique.²²⁴ L'activité du récepteur

CXCR4 serait donc influencée par la S1P et la présence de son récepteur S1P₁. Notre étude met également en évidence le rôle de SPHK1 dans la migration des cellules leucémiques via la voie signalétique CXCL12/CXCR4. Suite à l'inactivation du facteur de transcription ETV6, la surexpression de SPHK1 favoriserait la domiciliation ou la rétention des cellules leucémiques dans la moelle osseuse.

Nous avons également démontré que la surexpression de IL-18 favorise la migration des cellules leucémiques. À une concentration de 10 nM de CXCL12, IL-18 entraîne une augmentation du taux de migration des lymphocytes pré-B leucémiques. À notre connaissance, ceci représente la première évidence que IL-18 influence positivement la domiciliation des cellules leucémiques dans la moelle osseuse. Par contre, IL-18 peut induire l'expression de la chimiokine CXCL12 par les fibroblastes d'un modèle murin d'arthrite rhumatoïde.²²⁵ Ainsi, dans un contexte physiologique, la sécrétion de IL-18 dans le microenvironnement de la moelle osseuse pourrait également favoriser la production de CXCL12 par d'autres cellules hématopoïétiques. La chimiokine CXCL12 est également impliquée dans la différenciation des cellules dendritiques. Une étude sur le cancer de l'ovaire montre que la production de CXCL12 par la cellule tumorale inhibe la différenciation des cellules dendritiques.²²⁶ Ceci diminuerait la réponse immunitaire de la cellule dendritique envers la cellule tumorale.

La migration des cellules mésenchymales stromales via la voie CXCL12/CXCR4 requiert l'activation de la voie Jak2/STAT3.²²⁷ La phosphorylation de STAT3, qui peut être engendrée par IL-18, favoriserait la phosphorylation et l'activation du récepteur transmembranaire CXCR4.²²⁸ Ainsi, suite à l'inactivation du facteur de transcription ETV6, la surexpression de IL-18 par la cellule

leucémique favoriserait leur rétention dans la moelle osseuse. Ceci pourrait être accompli par la modulation de l'expression de CXCL12 et/ou l'activation du récepteur transmembranaire CXCR4. La rétention des lymphocytes pré-B leucémiques dans la moelle osseuse serait favorable durant les premières étapes de la leucémogénèse pédiatrique (la phase d'initiation) pour faciliter leur prolifération et leur envahissement dans la moelle osseuse.

Chez les cellules leucémiques, nous avons montré qu'une diminution de l'expression du récepteur transmembranaire PTGER4 nuit à la migration cellulaire induite par la voie de signalisation CXCL12/CXCR4. Quelques études ont rapporté le rôle de PTGER4 durant la migration cellulaire. Nous savons que l'activation de la voie de signalisation PGE₂/PTGER4 stimule l'expression de la chimiokine CXCL12 chez des fibroblastes.²²⁹ Durant l'initiation de la réponse immunitaire de la peau, le récepteur transmembranaire PTGER4 facilite également la migration des cellules de Langherans vers les ganglions lymphatiques.²³⁰ Ainsi, le récepteur transmembranaire PTGER4 pourrait également favoriser la rétention des cellules leucémiques dans la moelle osseuse.

Le rôle des gènes *SPHK1*, *IL-18* et *PTGER4* durant le développement de la LLA pré-B pédiatrique est présenté dans la figure 32.

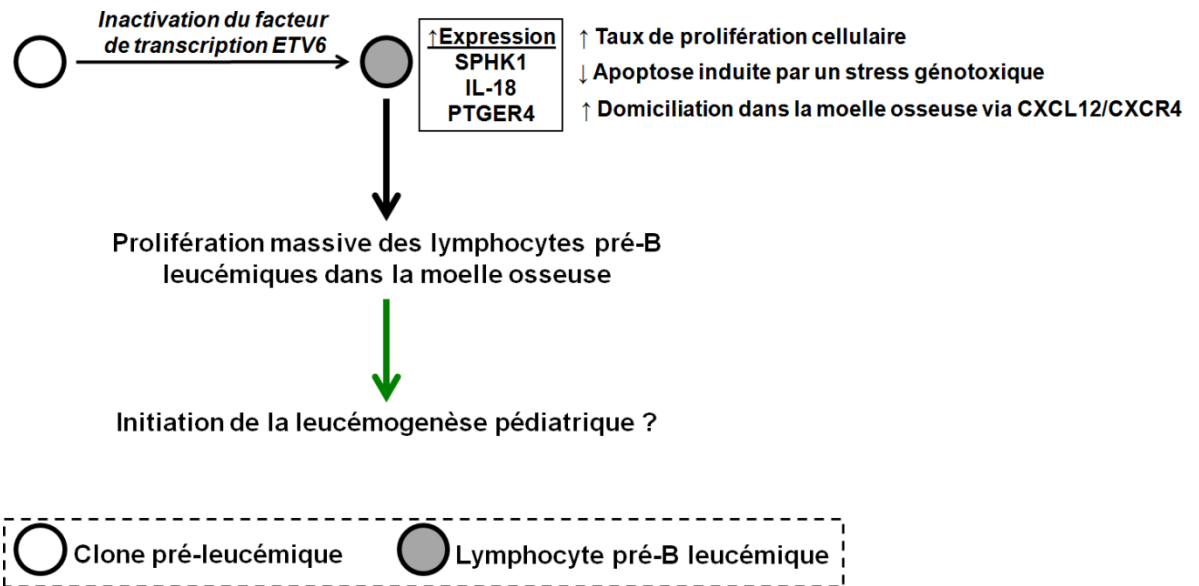


Figure 32. L'inactivation du facteur de transcription ETV6 est impliquée dans le développement de la LLA pré-B pédiatrique. (A) La LLA pré-B se déroule en trois étapes : latence, initiation et progression. (B) L'inactivation du facteur de transcription ETV6 entraîne une augmentation de l'expression des gènes *SPHK1*, *IL-18* et *PTGER4*. Ceci serait favorable à la prolifération des lymphocytes pré-B leucémiques dans la moelle osseuse. ETV6 pourrait donc favoriser l'initiation de la leucémogénèse pédiatrique.

Chapitre 5. Perspectives.

5.1. Le réseau de régulation génétique de ETV6.

L'inactivation du facteur de transcription ETV6 chez la LLA pré-B t(12;21)+ est un des événements génétiques les plus courants.^{103,105,106} Malgré cela, peu d'études ont tenté de comprendre le rôle des cibles transcriptionnelles de ETV6 durant la leucémogénèse pédiatrique. Cette étude a mené à l'identification de six nouvelles cibles transcriptionnelles directes de ETV6: *TP53* (p53 et Δ 133p53), *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* et *LUM*. Ces gènes présentent une expression dérégulée dans la LLA pré-B pédiatrique.¹⁴⁹ La régulation transcriptionnelle médiée par ETV6 requiert des mécanismes moléculaires qui dépendent du promoteur régulé, mais également du contexte cellulaire. Ces études ont été réalisées dans deux contextes cellulaires: HeLa (cervicale) et Jurkat (lymphocyte T leucémique). Les lymphocytes pré-B leucémiques, comme les cellules Reh, sont difficilement transfectables. Ceci limite grandement leur utilisation dans des essais de gène rapporteur. Pour remédier à la situation, il serait intéressant de cloner la construction promoteur-gène rapporteur dans un vecteur lentiviral et d'introduire la construction dans les cellules Reh via une transduction lentivirale. Ceci a été testé en utilisant la GFP/« green fluorescent protein » comme gène rapporteur. Malheureusement, l'activité des promoteurs étudiés était trop faible pour atteindre un signal de fluorescence intéressant. Cette expérience n'a donc pas permis de vérifier l'effet de ETV6 sur l'activité transcriptionnelle d'un promoteur. Pour obtenir un signal intéressant, il serait préférable d'utiliser la « Firefly luciférase » comme gène rapporteur. Il serait intéressant de créer un vecteur lentiviral qui posséderait à la fois la séquence promoteur-«Firefly luciférase » et la séquence du contrôle interne (promoteur CMV-« Renilla luciférase »). Puisque les cellules Reh

n'expriment pas ETV6, son expression serait être réintroduite via une transduction lentivirale (ADNc). Ceci permettrait d'étudier le réseau de régulation transcriptionnelle dans un contexte de lymphocyte pré-B leucémique.

L'expression de ETV6 dans les cellules HeLa utilisées pour les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine était dirigée par un système Tet-On inducible.¹⁴⁹ Ceci permettait de contrôler le niveau d'expression de ETV6 à des niveaux endogènes, limitant ainsi les phénomènes de liaison non spécifique entre le facteur de transcription ETV6 et la chromatine. Pour des expériences futures, il serait intéressant de répéter l'immunoprécipitation de la chromatine dans les cellules Reh par l'intermédiaire d'une transduction transitoire. Il sera alors important de contrôler finement le niveau d'expression de ETV6 pour maintenir un niveau d'expression similaire à celui retrouvé dans d'autres contextes cellulaires (ex. cellule HeLa).

Les études futures devront se concentrer sur l'identification de nouvelles cibles transcriptionnelles de ETV6 dans le contexte de la LLA pré-B pédiatrique. Elles devront également favoriser l'identification de nouveaux partenaires protéiques de ETV6 qui permettent de moduler son activité transcriptionnelle. Outre le complexe de répression N-CoR/SMRT/mSin3A/HDACs, nos connaissances sur les partenaires protéiques de ETV6 qui interviennent dans la régulation transcriptionnelle sont limitées. Il sera également intéressant d'étudier la régulation transcriptionnelle médiée par ETV6 dans un contexte différent de celui des promoteurs proximaux des gènes. Par exemple, ETV6 pourrait lier un élément de régulation génétique distal pour réprimer la transcription. Ceci pourrait être

vérifié avec la méthode de ChIP-seq qui vise à identifier, à l'échelle génomique, des régions de la chromatine liés par le facteur de transcription étudié.²³¹

Puisque les cibles transcriptionnelle de ETV6 peuvent être partagées entre les facteurs de transcription de la famille Ets (ex. promoteur des gènes *MMP-3* et *Bcl-X_L*)^{153,154}, il serait intéressant de vérifier le patron d'expression des facteurs de transcription Ets chez les enfants atteints de la LLA pré-B. Ceci pourrait se faire d'abord par des expériences de séquençage de l'exome, suivie d'une validation au niveau de l'ARNm et protéique chez le matériel tumoral de la LLA pré-B pédiatrique. L'inactivation de ETV6 risque de favoriser l'implantation d'un patron de régulation transcriptionnelle dans le lymphocyte pré-B leucémique qui serait différent de celui retrouvé chez le lymphocyte pré-B normal et/ou la cellule pré-leucémique. Par exemple, l'inactivation de ETV6 pourrait favoriser le recrutement d'activateurs transcriptionnels de la famille Ets.

5.2. Les cibles transcriptionnelles de ETV6 et la leucémogènèse pédiatrique.

Le niveau d'expression des gènes *SPHK1*, *IL-18* et *PTGER4* influence positivement la prolifération, la survie et la migration du lymphocyte pré-B leucémique *in vitro*. Ceci a été confirmé par des études fonctionnelles dans les cellules Reh, où l'expression de chaque gène était modulée séparément par une transduction transitoire (shRNA ou ADNc). Il est envisageable qu'une modulation de l'expression simultanée des gènes *SPHK1*, *IL-18* et *PTGER4* augmenterait l'amplitude de la réponse biologique responsable du comportement du lymphocyte

pré-B leucémique. Cette modulation de l'expression simultanée pourrait se faire via l'utilisation d'un vecteur lentiviral contenant plusieurs shRNA, tel que développé par Dr. Gerardo Ferbeyre (Département de biochimie, Faculté de Médecine, Université de Montréal). Il serait également intéressant de vérifier l'influence du niveau d'expression des gènes *SPHK1*, *IL-18* et *PTGER4* sur l'efficacité de la réponse thérapeutique. Ceci pourrait être réalisé dans les cellules Reh, mais également avec des cellules tumorales de patients atteints de la LLA pré-B pédiatrique.

Tel que mentionné précédemment, le rôle des isoformes du gène *TP53* et du gène *LUM* durant la leucémogénèse pédiatrique n'a pas pu être étudié. Ceci est dû à des contraintes expérimentales. Il n'existe présentement aucun anticorps qui permet de reconnaître de façon spécifique chaque isoforme codé par le gène *TP53*. Étant donné qu'il existe beaucoup de similitudes entre les séquences codantes des isoformes du gène *TP53*, il est présentement difficile de moduler l'expression de chaque isoforme séparément via un shRNA. Les cellules Reh expriment les 6 transcrits et probablement les 12 protéines codant pour les isoformes de *TP53*. Étant donné la découverte récente de ces isoformes.^{156,178} il faudra attendre la synthèse d'anticorps spécifiques à chaque isoforme codé par le gène *TP53*. Dans le cas de *LUM*, il était impossible de détecter son expression dans les cellules Reh. Ceci pourrait être dû à une mauvaise stabilité du protéoglycan dans des conditions *in vitro*. Il est également possible que la cellule Reh soit incapable de synthétiser lumican.

5.3. Développement de nouveaux traitements contre la LLA pré-B pédiatrique.

L'absence d'un modèle murin qui réplique adéquatement la pathologie de la LLA pré-B pédiatrique humaine est très limitant. Il est donc difficile de vérifier le rôle des gènes *SPHK1*, *IL-18* et *PTGER4* durant le développement de la LLA pré-B pédiatrique. Ceci complique également le développement de nouveaux traitements thérapeutiques qui présenteront une meilleure spécificité envers les lymphocytes pré-B leucémiques dans un contexte physiologique. Les traitements actuels de la LLA pré-B t(12;21)+ sont efficaces, mais ils sont également très agressifs. Il sera donc important de privilégier davantage le développement de nouvelles thérapies présentant une meilleure spécificité.

L'activité biologique du lipide kinase SPHK1 et du récepteur transmembranaire PTGER4 est modulable par des molécules chimiques (ex. l'antagoniste de PTGER4, L-161982).^{195,213} Il pourrait être intéressant de vérifier le potentiel de ces molécules dans le développement de nouveaux traitements thérapeutiques contre la LLA pré-B pédiatrique. Des études pharmacologiques permettraient de vérifier la spécificité de ces molécules sur l'activité biologique de SPHK1 et PTGER4 dans des lymphocytes pré-B leucémiques, mais également dans des cellules normales. Ceci pourrait permettre d'améliorer la qualité de vie des survivants de la LLA pré-B à moyen- et à long-terme.

Chapitre 6. Conclusion.

Cette thèse de doctorat a permis d'approfondir le rôle du facteur de transcription ETV6 dans la leucémogénèse pédiatrique. Des études de régulation transcriptionnelle ont mené à l'identification de six nouvelles cibles transcriptionnelles directes de ETV6: *TP53* (p53 et $\Delta 133p53$), *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* et *LUM*. Ceci est intéressant puisque seulement cinq gènes étaient connus comme étant des cibles transcriptionnelles de ETV6. L'étude de ces nouvelles cibles transcriptionnelles de ETV6 montre que la répression transcriptionnelle se fait dans une région près du promoteur de base en utilisant des mécanismes moléculaires qui varient en fonction du promoteur régulé et du contexte cellulaire. La présence du domaine fonctionnel PNT et ETS est essentielle à l'atteinte d'un bon niveau de répression transcriptionnelle par ETV6, suggérant la formation d'un complexe de répression transcriptionnelle sur un ou plusieurs sites EBS consensus. Ceci a été confirmé pour le promoteur classique de *TP53*, mais également pour les promoteurs des gènes *SPHK1*, *IL-18*, *PTGER4* et *LUM*. Les sites EBS consensus du promoteur de base alternatif de *TP53* n'étant pas reconnus par ETV6, cette étude suggère également que ETV6 agirait comme co-facteur transcriptionnel. Des études futures permettront l'identification de nouveaux partenaires d'interaction protéique d'ETV6.

Les études fonctionnelles ont été réalisées dans un modèle cellulaire qui réplique la pathologie et le contexte génétique étudiés, soit l'inactivation du facteur de transcription ETV6 en présence de la translocation t(12;21) dans un lymphocyte pré-B leucémique. Une augmentation de l'expression des cibles transcriptionnelles de ETV6 (*SPHK1*, *IL-18* et *PTGER4*) favorise une accélération du taux de prolifération cellulaire et une diminution de l'activation de l'apoptose suite à un

stress génotoxique. Elle favorise également la migration cellulaire dirigée par la voie signalétique CXCL12/CXCR4. Ceci serait favorable durant les premières étapes du développement de la maladie, puisque les cibles transcriptionnelles de ETV6 (SPHK1, IL-18 et PTGER4) favoriseraient la rétention et prolifération des cellules leucémiques dans la moelle osseuse. Cette étude est la première à étudier le rôle des cibles transcriptionnelles de ETV6 sur le comportement du lymphocyte pré-B leucémique. L'inactivation du facteur de transcription ETV6 pourrait donc être favorable à l'initiation de la leucémogénèse pédiatrique. Ceci devra être confirmé dans des modèles murins permettant de répliquer la pathologie de la LLA pré-B pédiatrique. Malheureusement, les modèles actuels manquent de spécificité au niveau du contexte cellulaire et de la latence de la pathologie.

Cette étude propose le rôle des gènes *SPHK1*, *IL-18* et *PTGER4* durant la leucémogénèse pédiatrique. Il sera important d'étendre le réseau de régulation génétique du facteur de transcription ETV6 pour identifier de nouveaux joueurs modulant le comportement des lymphocytes pré-B leucémiques. Ceci permettra d'explorer de nouvelles avenues thérapeutiques qui présenteraient une meilleure spécificité envers l'étiologie de la maladie.

Références.

1. cancer, C.d.d.I.S.c.d. Statistiques canadiennes sur le cancer 2011. (ed. cancer, S.c.d.) (Toronto, 2011).
2. Jemal, A. *et al.* Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 56, 106-30 (2006).
3. Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. & Ward, E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60, 277-300 (2010).
4. Woodruff, T.J. *et al.* Trends in environmentally related childhood illnesses. *Pediatrics* 113, 1133-40 (2004).
5. Linabery, A.M. & Ross, J.A. Trends in childhood cancer incidence in the U.S. (1992-2004). *Cancer* 112, 416-32 (2008).
6. Pui, C.H., Carroll, W.L., Meshinchi, S. & Arceci, R.J. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 29, 551-65 (2011).
7. Greaves, M. Darwin and evolutionary tales in leukemia. The Ham-Wasserman Lecture. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 3-12 (2009).
8. Maroulakou, I.G. & Bowe, D.B. Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene* 19, 6432-42 (2000).
9. Greaves, M. In utero origins of childhood leukaemia. *Early Hum Dev* 81, 123-9 (2005).
10. Wiemels, J.L. *et al.* Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet* 354, 1499-503 (1999).
11. Greaves, M.F. & Wiemels, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 3, 639-49 (2003).
12. Greaves, M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 6, 193-203 (2006).
13. Sinnett, D., Labuda, D. & Krajcinovic, M. Challenges identifying genetic determinants of pediatric cancers--the childhood leukemia experience. *Fam Cancer* 5, 35-47 (2006).
14. Crazzolara, R. *et al.* High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 115, 545-53 (2001).
15. Kinoshita, K. *et al.* Clinical, hematologic, and pathologic features of leukemic T-cell lymphoma. *Cancer* 50, 1554-62 (1982).
16. Pui, C.H. Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Formos Med Assoc* 109, 777-87 (2010).
17. Pui, C.H., Robison, L.L. & Look, A.T. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 371, 1030-43 (2008).
18. Pui, C.H. *et al.* Extended follow-up of long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 349, 640-9 (2003).
19. Kadan-Lottick, N.S. *et al.* Neurocognitive functioning in adult survivors of childhood non-central nervous system cancers. *J Natl Cancer Inst* 102, 881-93 (2010).

20. Geenen, M.M. *et al.* Medical assessment of adverse health outcomes in long-term survivors of childhood cancer. *JAMA* 297, 2705-15 (2007).
21. Lipshultz, S.E. *et al.* Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 23, 2629-36 (2005).
22. Kadan-Lottick, N.S. *et al.* Osteonecrosis in adult survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Clin Oncol* 26, 3038-45 (2008).
23. Dockerty, J.D., Skegg, D.C. & Williams, S.M. Economic effects of childhood cancer on families. *J Paediatr Child Health* 39, 254-8 (2003).
24. Syse, A., Larsen, I.K. & Tretli, S. Does cancer in a child affect parents' employment and earnings? A population-based study. *Cancer Epidemiol* 35, 298-305 (2011).
25. Ma, X., Urayama, K., Chang, J., Wiemels, J.L. & Buffler, P.A. Infection and pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cells Mol Dis* 42, 117-20 (2009).
26. McNally, R.J. & Parker, L. Environmental factors and childhood acute leukemias and lymphomas. *Leuk Lymphoma* 47, 583-98 (2006).
27. Seif, A.E. Pediatric leukemia predisposition syndromes: clues to understanding leukemogenesis. *Cancer Genet* 204, 227-44 (2011).
28. Maia, A.T. *et al.* Prenatal origin of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in identical twins. *Leukemia* 17, 2202-6 (2003).
29. Cazzaniga, G. *et al.* Developmental origins and impact of BCR-ABL1 fusion and IKZF1 deletions in monozygotic twins with Ph+ acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 118, 5559-64 (2011).
30. Hong, D. *et al.* Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science* 319, 336-9 (2008).
31. Bueno, C., Montes, R., Catalina, P., Rodriguez, R. & Menendez, P. Insights into the cellular origin and etiology of the infant pro-B acute lymphoblastic leukemia with MLL-AF4 rearrangement. *Leukemia* 25, 400-10 (2011).
32. Rudant, J. *et al.* Family history of cancer in children with acute leukemia, Hodgkin's lymphoma or non-Hodgkin's lymphoma: the ESCALE study (SFCE). *Int J Cancer* 121, 119-26 (2007).
33. Zierhut, H., Linet, M.S., Robison, L.L., Severson, R.K. & Spector, L. Family history of cancer and non-malignant diseases and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: A Children's Oncology Group Study. *Cancer Epidemiol* 36, 45-51 (2012).
34. Wen, W.Q. *et al.* Family history of cancer and autoimmune disease and risk of leukemia in infancy: a report from the Children's Cancer Group (United States and Canada). *Cancer Causes Control* 9, 161-71 (1998).
35. Felix, C.A. *et al.* Absence of hereditary p53 mutations in 10 familial leukemia pedigrees. *J Clin Invest* 90, 653-8 (1992).
36. Paulsson, K. & Johansson, B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 48, 637-60 (2009).
37. Faderl, S. *et al.* Adult acute lymphoblastic leukemia: concepts and strategies. *Cancer* 116, 1165-76 (2010).

38. Maia, A.T. *et al.* Identification of preleukemic precursors of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in cord blood. *Genes Chromosomes Cancer* 40, 38-43 (2004).
39. Salzer, W.L. *et al.* Long-term results of the pediatric oncology group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1984-2001: a report from the children's oncology group. *Leukemia* 24, 355-70 (2010).
40. Taketani, T. *et al.* FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy. *Blood* 103, 1085-8 (2004).
41. Paulsson, K. *et al.* Mutations of FLT3, NRAS, KRAS, and PTPN11 are frequent and possibly mutually exclusive in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 26-33 (2008).
42. Brown, P. *et al.* FLT3 inhibition selectively kills childhood acute lymphoblastic leukemia cells with high levels of FLT3 expression. *Blood* 105, 812-20 (2005).
43. Armstrong, S.A. *et al.* MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 30, 41-7 (2002).
44. Yeoh, E.J. *et al.* Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 1, 133-43 (2002).
45. Mullighan, C.G. *et al.* Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 41, 1243-6 (2009).
46. Wiemels, J.L. *et al.* Site-specific translocation and evidence of postnatal origin of the t(1;19) E2A-PBX1 fusion in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15101-6 (2002).
47. Mazieres, J. *et al.* Inhibition of Wnt16 in human acute lymphoblastoid leukemia cells containing the t(1;19) translocation induces apoptosis. *Oncogene* 24, 5396-400 (2005).
48. Chiaretti, S. *et al.* ZAP-70 expression in acute lymphoblastic leukemia: association with the E2A/PBX1 rearrangement and the pre-B stage of differentiation and prognostic implications. *Blood* 107, 197-204 (2006).
49. Schweighoffer, E., Vanes, L., Mathiot, A., Nakamura, T. & Tybulewicz, V.L. Unexpected requirement for ZAP-70 in pre-B cell development and allelic exclusion. *Immunity* 18, 523-33 (2003).
50. Waurzyniak, B.J. *et al.* Distinct in vivo engraftment and growth patterns of t(1;19)+/E2A-PBX1+ and t(9;22)+/BCR-ABL+ human leukemia cells in SCID mice. *Leuk Lymphoma* 32, 77-87 (1998).
51. Pui, C.H. & Evans, W.E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 354, 166-78 (2006).
52. Klein, F. *et al.* The BCR-ABL1 kinase bypasses selection for the expression of a pre-B cell receptor in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med* 199, 673-85 (2004).

53. Huettner, C.S., Zhang, P., Van Etten, R.A. & Tenen, D.G. Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. *Nat Genet* 24, 57-60 (2000).
54. Gruber, F., Mustjoki, S. & Porkka, K. Impact of tyrosine kinase inhibitors on patient outcomes in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 145, 581-97 (2009).
55. Schultz, K.R. *et al.* Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. *J Clin Oncol* 27, 5175-81 (2009).
56. Klein, F. *et al.* BCR-ABL1 induces aberrant splicing of IKAROS and lineage infidelity in pre-B lymphoblastic leukemia cells. *Oncogene* 25, 1118-24 (2006).
57. Mullighan, C.G. *et al.* Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 360, 470-80 (2009).
58. Virely, C. *et al.* Haploinsufficiency of the IKZF1 (IKAROS) tumor suppressor gene cooperates with BCR-ABL in a transgenic model of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 24, 1200-4 (2010).
59. Iacobucci, I. *et al.* The PAX5 gene is frequently rearranged in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia but is not associated with outcome. A report on behalf of the GIMEMA Acute Leukemia Working Party. *Haematologica* 95, 1683-90 (2010).
60. Kim-Rouille, M.H., MacGregor, A., Wiedemann, L.M., Greaves, M.F. & Navarrete, C. MLL-AF4 gene fusions in normal newborns. *Blood* 93, 1107-8 (1999).
61. Metzler, M. *et al.* A conditional model of MLL-AF4 B-cell tumourigenesis using inverter technology. *Oncogene* 25, 3093-103 (2006).
62. Montes, R. *et al.* Enforced expression of MLL-AF4 fusion in cord blood CD34+ cells enhances the hematopoietic repopulating cell function and clonogenic potential but is not sufficient to initiate leukemia. *Blood* 117, 4746-58 (2011).
63. Krivtsov, A.V. *et al.* H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. *Cancer Cell* 14, 355-68 (2008).
64. Zeisig, B.B., Cheung, N., Yeung, J. & So, C.W. Reconstructing the disease model and epigenetic networks for MLL-AF4 leukemia. *Cancer Cell* 14, 345-7 (2008).
65. Feil, R. & Fraga, M.F. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet* 13, 97-109 (2011).
66. Attarbaschi, A. *et al.* Minimal residual disease values discriminate between low and high relapse risk in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and an intrachromosomal amplification of chromosome 21: the Austrian and German acute lymphoblastic leukemia Berlin-Frankfurt-Munster (ALL-BFM) trials. *J Clin Oncol* 26, 3046-50 (2008).
67. Lange, B. The management of neoplastic disorders of haematopoiesis in children with Down's syndrome. *Br J Haematol* 110, 512-24 (2000).

68. Smith, M. *et al.* Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 14, 18-24 (1996).
69. Nachman, J.B. *et al.* Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 110, 1112-5 (2007).
70. Dalla-Favera, R. *et al.* Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7824-7 (1982).
71. Malempati, S. *et al.* Aberrant stabilization of c-Myc protein in some lymphoblastic leukemias. *Leukemia* 20, 1572-81 (2006).
72. Delgado, M.D. & Leon, J. Myc roles in hematopoiesis and leukemia. *Genes Cancer* 1, 605-16 (2010).
73. Cardone, M. *et al.* The novel ETS factor TEL2 cooperates with Myc in B lymphomagenesis. *Mol Cell Biol* 25, 2395-405 (2005).
74. Carella, C. *et al.* The ETS factor TEL2 is a hematopoietic oncoprotein. *Blood* 107, 1124-32 (2006).
75. Bateman, C.M. *et al.* Acquisition of genome-wide copy number alterations in monozygotic twins with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 115, 3553-8 (2010).
76. Ford, A.M. *et al.* Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4584-8 (1998).
77. Hjalgrim, L.L. *et al.* Presence of clone-specific markers at birth in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer* 87, 994-9 (2002).
78. McHale, C.M. *et al.* Prenatal origin of TEL-AML1-positive acute lymphoblastic leukemia in children born in California. *Genes Chromosomes Cancer* 37, 36-43 (2003).
79. Gruhn, B. *et al.* Prenatal origin of childhood acute lymphoblastic leukemia, association with birth weight and hyperdiploidy. *Leukemia* 22, 1692-7 (2008).
80. Lausten-Thomsen, U. *et al.* Prevalence of t(12;21)[ETV6-RUNX1]-positive cells in healthy neonates. *Blood* 117, 186-9 (2011).
81. Nielsen, J.S. & McNagny, K.M. CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery. *Microcirculation* 16, 487-96 (2009).
82. Deaglio, S. & Malavasi, F. The CD38/CD157 mammalian gene family: An evolutionary paradigm for other leukocyte surface enzymes. *Purinergic Signal* 2, 431-41 (2006).
83. Fearon, D.T. & Carroll, M.C. Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annu Rev Immunol* 18, 393-422 (2000).
84. van Delft, F.W. *et al.* Clonal origins of relapse in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 117, 6247-54 (2011).
85. Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S.W., Grosveld, G. & Downing, J.R. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84, 321-30 (1996).

86. Wang, Q. *et al.* Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3444-9 (1996).
87. Ichikawa, M. *et al.* AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med* 10, 299-304 (2004).
88. Andreasson, P., Schwaller, J., Anastasiadou, E., Aster, J. & Gilliland, D.G. The expression of ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) is not sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines in vitro or the induction of hematologic disease in vivo. *Cancer Genet Cytogenet* 130, 93-104 (2001).
89. Reik, W. *et al.* Provision of the immunoglobulin heavy chain enhancer downstream of a test gene is sufficient to confer lymphoid-specific expression in transgenic mice. *Eur J Immunol* 17, 465-9 (1987).
90. Schwaller, J. *et al.* Transformation of hematopoietic cell lines to growth-factor independence and induction of a fatal myelo- and lymphoproliferative disease in mice by retrovirally transduced TEL/JAK2 fusion genes. *EMBO J* 17, 5321-33 (1998).
91. Lacronique, V. *et al.* A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 278, 1309-12 (1997).
92. Bernardin, F. *et al.* TEL-AML1, expressed from t(12;21) in human acute lymphocytic leukemia, induces acute leukemia in mice. *Cancer Res* 62, 3904-8 (2002).
93. Kamijo, T. *et al.* Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91, 649-59 (1997).
94. Pomerantz, J. *et al.* The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92, 713-23 (1998).
95. Morrow, M., Horton, S., Kioussis, D., Brady, H.J. & Williams, O. TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity. *Blood* 103, 3890-6 (2004).
96. Tsuzuki, S., Seto, M., Greaves, M. & Enver, T. Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8443-8 (2004).
97. Sinnott, D., N'Diaye, N., St-Onge, P. & Healy, J. [Childhood leukemia: a genetic disease!]. *Med Sci (Paris)* 23, 968-74 (2007).
98. Fischer, M. *et al.* Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model. *Oncogene* 24, 7579-91 (2005).
99. Seita, J. & Weissman, I.L. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2, 640-53 (2010).
100. Ford, A.M. *et al.* The TEL-AML1 leukemia fusion gene dysregulates the TGF-beta pathway in early B lineage progenitor cells. *J Clin Invest* 119, 826-36 (2009).
101. Jones, R.G. & Thompson, C.B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev* 23, 537-48 (2009).

102. van der Weyden, L. *et al.* Modeling the evolution of ETV6-RUNX1-induced B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in mice. *Blood* (2011).
103. Lilljebjorn, H. *et al.* The correlation pattern of acquired copy number changes in 164 ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemias. *Hum Mol Genet* 19, 3150-8 (2010).
104. Brodeur, G.M., Tsiatis, A.A., Williams, D.L., Luthardt, F.W. & Green, A.A. Statistical analysis of cytogenetic abnormalities in human cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet* 7, 137-52 (1982).
105. Montpetit, A., Boily, G. & Sinnett, D. A detailed transcriptional map of the chromosome 12p12 tumour suppressor locus. *Eur J Hum Genet* 10, 62-71 (2002).
106. Montpetit, A. *et al.* Mutational and expression analysis of the chromosome 12p candidate tumor suppressor genes in pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18, 1499-504 (2004).
107. Patel, N. *et al.* Expression profile of wild-type ETV6 in childhood acute leukaemia. *Br J Haematol* 122, 94-8 (2003).
108. Agape, P. *et al.* Analysis of ETV6 and ETV6-AML1 proteins in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 98, 234-9 (1997).
109. Zuna, J. *et al.* TEL deletion analysis supports a novel view of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 10, 5355-60 (2004).
110. Seth, A. & Watson, D.K. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur J Cancer* 41, 2462-78 (2005).
111. Price, M.D. & Lai, Z. The yan gene is highly conserved in *Drosophila* and its expression suggests a complex role throughout development. *Dev Genes Evol* 209, 207-17 (1999).
112. Baens, M., Peeters, P., Guo, C., Aerssens, J. & Marynen, P. Genomic organization of TEL: the human ETS-variant gene 6. *Genome Res* 6, 404-13 (1996).
113. Lopez, R.G. *et al.* TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem* 274, 30132-8 (1999).
114. Golub, T.R., Barker, G.F., Lovett, M. & Gilliland, D.G. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 77, 307-16 (1994).
115. Bohlander, S.K. ETV6: a versatile player in leukemogenesis. *Semin Cancer Biol* 15, 162-74 (2005).
116. Fuka, G., Kauer, M., Kofler, R., Haas, O.A. & Panzer-Grumayer, R. The leukemia-specific fusion gene ETV6/RUNX1 perturbs distinct key biological functions primarily by gene repression. *PLoS One* 6, e26348 (2011).
117. Wang, L.C. *et al.* Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *EMBO J* 16, 4374-83 (1997).
118. Poirel, H. *et al.* The TEL gene products: nuclear phosphoproteins with DNA binding properties. *Oncogene* 14, 349-57 (1997).

119. Guidez, F. *et al.* Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. *Blood* 96, 2557-61 (2000).
120. Wang, L. & Hiebert, S.W. TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3. *Oncogene* 20, 3716-25 (2001).
121. Chakrabarti, S.R. & Nucifora, G. The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 871-7 (1999).
122. Petrie, K. *et al.* The histone deacetylase 9 gene encodes multiple protein isoforms. *J Biol Chem* 278, 16059-72 (2003).
123. Million, R.P., Harakawa, N., Roumiantsev, S., Varticovski, L. & Van Etten, R.A. A direct binding site for Grb2 contributes to transformation and leukemogenesis by the Tel-Abl (ETV6-Abl) tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 24, 4685-95 (2004).
124. Park, H., Seo, Y., Kim, J.I., Kim, W.J. & Choe, S.Y. Identification of the nuclear localization motif in the ETV6 (TEL) protein. *Cancer Genet Cytogenet* 167, 117-21 (2006).
125. Van Vlierberghe, P. *et al.* ETV6 mutations in early immature human T cell leukemias. *J Exp Med* 208, 2571-9 (2011).
126. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S. *et al.* Somatic heterozygous mutations in ETV6 (TEL) and frequent absence of ETV6 protein in acute myeloid leukemia. *Oncogene* 24, 4129-37 (2005).
127. Tognon, C. *et al.* Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. *Cancer Cell* 2, 367-76 (2002).
128. Kibel, A.S., Faith, D.A., Bova, G.S. & Isaacs, W.B. Mutational analysis of ETV6 in prostate carcinoma. *Prostate* 52, 305-10 (2002).
129. Jousset, C. *et al.* A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein. *EMBO J* 16, 69-82 (1997).
130. Kwiatkowski, B.A. *et al.* The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem* 273, 17525-30 (1998).
131. Sharrocks, A.D. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 827-37 (2001).
132. Kwiatkowski, B.A., Zielinska-Kwiatkowska, A.G., Bauer, T.R., Jr. & Hickstein, D.D. The ETS family member Tel antagonizes the Fli-1 phenotype in hematopoietic cells. *Blood Cells Mol Dis* 26, 84-90 (2000).
133. Potter, M.D., Buijs, A., Kreider, B., van Rompaey, L. & Grosveld, G.C. Identification and characterization of a new human ETS-family transcription factor, TEL2, that is expressed in hematopoietic tissues and can associate with TEL1/ETV6. *Blood* 95, 3341-8 (2000).
134. Spiekermann, K. *et al.* Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins with protein tyrosine kinase activity and is sufficient for transformation of hematopoietic precursor cells. *Exp Hematol* 30, 262-71 (2002).

135. Schick, N., Oakeley, E.J., Hynes, N.E. & Badache, A. TEL/ETV6 is a signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3)-induced repressor of Stat3 activity. *J Biol Chem* 279, 38787-96 (2004).
136. Yu, H., Kortylewski, M. & Pardoll, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 7, 41-51 (2007).
137. Boccuni, P., MacGrogan, D., Scandura, J.M. & Nimer, S.D. The human L(3)MBT polycomb group protein is a transcriptional repressor and interacts physically and functionally with TEL (ETV6). *J Biol Chem* 278, 15412-20 (2003).
138. Bosselut, R., Levin, J., Adjadj, E. & Ghysdael, J. A single amino-acid substitution in the Ets domain alters core DNA binding specificity of Ets1 to that of the related transcription factors Elf1 and E74. *Nucleic Acids Res* 21, 5184-91 (1993).
139. Kuwata, T. *et al.* Gamma interferon triggers interaction between ICSBP (IRF-8) and TEL, recruiting the histone deacetylase HDAC3 to the interferon-responsive element. *Mol Cell Biol* 22, 7439-48 (2002).
140. Huang, W. *et al.* Interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) decreases beta-catenin activity in myeloid cells by repressing GAS2 transcription. *Mol Cell Biol* 30, 4575-94 (2010).
141. Chakrabarti, S.R. *et al.* Modulation of TEL transcription activity by interaction with the ubiquitin-conjugating enzyme UBC9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7467-72 (1999).
142. Chakrabarti, S.R., Sood, R., Nandi, S. & Nucifora, G. Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13281-5 (2000).
143. Hanson, C.A., Wood, L.D. & Hiebert, S.W. Cellular stress triggers TEL nuclear export via two genetically separable pathways. *J Cell Biochem* 104, 488-98 (2008).
144. Roukens, M.G. *et al.* Identification of a new site of sumoylation on Tel (ETV6) uncovers a PIAS-dependent mode of regulating Tel function. *Mol Cell Biol* 28, 2342-57 (2008).
145. Wang, L.C. *et al.* The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* 12, 2392-402 (1998).
146. Hock, H. *et al.* Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev* 18, 2336-41 (2004).
147. Takahashi, W., Sasaki, K., Kvomatsu, N. & Mitani, K. TEL/ETV6 accelerates erythroid differentiation and inhibits megakaryocytic maturation in a human leukemia cell line UT-7/GM. *Cancer Sci* 96, 340-8 (2005).
148. Ciau-Uitz, A., Pinheiro, P., Gupta, R., Enver, T. & Patient, R. Tel1/ETV6 specifies blood stem cells through the agency of VEGF signaling. *Dev Cell* 18, 569-78 (2010).
149. Boily, G., Larose, J., Langlois, S. & Sinnett, D. Identification of transcripts modulated by ETV6 expression. *Br J Haematol* 136, 48-62 (2007).

150. Nowling, T.K., Fulton, J.D., Chike-Harris, K. & Gilkeson, G.S. Ets factors and a newly identified polymorphism regulate Fli1 promoter activity in lymphocytes. *Mol Immunol* 45, 1-12 (2008).
151. Yamagata, T., Maki, K., Waga, K. & Mitani, K. TEL/ETV6 induces apoptosis in 32D cells through p53-dependent pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 347, 517-26 (2006).
152. Rompaey, L.V., Potter, M., Adams, C. & Grosveld, G. Tel induces a G1 arrest and suppresses Ras-induced transformation. *Oncogene* 19, 5244-50 (2000).
153. Fenrick, R. *et al.* TEL, a putative tumor suppressor, modulates cell growth and cell morphology of ras-transformed cells while repressing the transcription of stromelysin-1. *Mol Cell Biol* 20, 5828-39 (2000).
154. Irvin, B.J. *et al.* TEL, a putative tumor suppressor, induces apoptosis and represses transcription of Bcl-XL. *J Biol Chem* 278, 46378-86 (2003).
155. Fears, S. *et al.* Functional characterization of ETV6 and ETV6/CBFA2 in the regulation of the MCSFR proximal promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1949-54 (1997).
156. Bourdon, J.C. *et al.* p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* 19, 2122-37 (2005).
157. Slatter, T.L. *et al.* Hyperproliferation, cancer, and inflammation in mice expressing a {Delta}133p53-like isoform. *Blood* (2011).
158. Peller, S. & Rotter, V. TP53 in hematological cancer: low incidence of mutations with significant clinical relevance. *Hum Mutat* 21, 277-84 (2003).
159. Matys, V. *et al.* TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 34, D108-10 (2006).
160. Aoubala, M. *et al.* p53 directly transactivates Delta133p53alpha, regulating cell fate outcome in response to DNA damage. *Cell Death Differ* 18, 248-58 (2011).
161. Vinson, C., Chatterjee, R. & Fitzgerald, P. Transcription factor binding sites and other features in human and Drosophila proximal promoters. *Subcell Biochem* 52, 205-22 (2011).
162. Yang, C., Shapiro, L.H., Rivera, M., Kumar, A. & Brindle, P.K. A role for CREB binding protein and p300 transcriptional coactivators in Ets-1 transactivation functions. *Mol Cell Biol* 18, 2218-29 (1998).
163. Jayaraman, G. *et al.* p300/cAMP-responsive element-binding protein interactions with ets-1 and ets-2 in the transcriptional activation of the human stromelysin promoter. *J Biol Chem* 274, 17342-52 (1999).
164. Cao, X. *et al.* Up-regulation of Bcl-xl by hepatocyte growth factor in human mesothelioma cells involves ETS transcription factors. *Am J Pathol* 175, 2207-16 (2009).
165. Hollenhorst, P.C., McIntosh, L.P. & Graves, B.J. Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. *Annu Rev Biochem* 80, 437-71 (2011).
166. Fenrick, R. *et al.* Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein. *Mol Cell Biol* 19, 6566-74 (1999).

167. Kim, C.A. *et al.* Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression. *EMBO J* 20, 4173-82 (2001).
168. Wood, L.D., Irvin, B.J., Nucifora, G., Luce, K.S. & Hiebert, S.W. Small ubiquitin-like modifier conjugation regulates nuclear export of TEL, a putative tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3257-62 (2003).
169. Green, S.M., Coyne, H.J., 3rd, McIntosh, L.P. & Graves, B.J. DNA binding by the ETS protein TEL (ETV6) is regulated by autoinhibition and self-association. *J Biol Chem* 285, 18496-504 (2010).
170. Sasaki, K. *et al.* Functional analysis of a dominant-negative DeltaETS TEL/ETV6 isoform. *Biochem Biophys Res Commun* 317, 1128-37 (2004).
171. Li, V., Raouf, A., Kitching, R. & Seth, A. Ets2 transcription factor inhibits mineralization and affects target gene expression during osteoblast maturation. *In Vivo* 18, 517-24 (2004).
172. Venanzoni, M.C., Robinson, L.R., Hodge, D.R., Kola, I. & Seth, A. ETS1 and ETS2 in p53 regulation: spatial separation of ETS binding sites (EBS) modulate protein: DNA interaction. *Oncogene* 12, 1199-1204 (1996).
173. Baillat, D., Laitem, C., Leprivier, G., Margerin, C. & Aumercier, M. Ets-1 binds cooperatively to the palindromic Ets-binding sites in the p53 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 378, 213-7 (2009).
174. Cheung, K.J., Horsman, D.E. & Gascoyne, R.D. The significance of TP53 in lymphoid malignancies: mutation prevalence, regulation, prognostic impact and potential as a therapeutic target. *Br J Haematol* 146, 257-69 (2009).
175. Graupner, V., Schulze-Osthoff, K., Essmann, F. & Janicke, R.U. Functional characterization of p53beta and p53gamma, two isoforms of the tumor suppressor p53. *Cell Cycle* 8, 1238-48 (2009).
176. Fujita, K. *et al.* p53 isoforms Delta133p53 and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nat Cell Biol* 11, 1135-42 (2009).
177. Ungewitter, E. & Scrable, H. Delta40p53 controls the switch from pluripotency to differentiation by regulating IGF signaling in ESCs. *Genes Dev* 24, 2408-19 (2010).
178. Marcel, V. *et al.* Delta160p53 is a novel N-terminal p53 isoform encoded by Delta133p53 transcript. *FEBS Lett* 584, 4463-8 (2010).
179. Leygue, E. *et al.* Expression of lumican in human breast carcinoma. *Cancer Res* 58, 1348-52 (1998).
180. Leygue, E. *et al.* Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma. *J Pathol* 192, 313-20 (2000).
181. Matsuda, Y. *et al.* Expression and roles of lumican in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 33, 1177-85 (2008).
182. Williams, K.E., Fulford, L.A. & Albig, A.R. Lumican reduces tumor growth via induction of fas-mediated endothelial cell apoptosis. *Cancer Microenviron* 4, 115-26 (2010).

183. Zeltz, C. *et al.* Lumican inhibits cell migration through alpha2beta1 integrin. *Exp Cell Res* 316, 2922-31 (2010).
184. Spiegel, S. & Milstien, S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat Rev Immunol* 11, 403-15 (2011).
185. Sarkar, S. *et al.* Sphingosine kinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer cells. *FEBS Lett* 579, 5313-7 (2005).
186. Pchejetski, D. *et al.* Sphingosine kinase-1 as a chemotherapy sensor in prostate adenocarcinoma cell and mouse models. *Cancer Res* 65, 11667-75 (2005).
187. Le Scolan, E. *et al.* Overexpression of sphingosine kinase 1 is an oncogenic event in erythroleukemic progression. *Blood* 106, 1808-16 (2005).
188. Guan, H. *et al.* Sphingosine kinase 1 is overexpressed and promotes proliferation in human thyroid cancer. *Mol Endocrinol* 25, 1858-66 (2011).
189. Fuereder, T. *et al.* Sphingosine kinase 1 is a relevant molecular target in gastric cancer. *Anticancer Drugs* 22, 245-52 (2011).
190. Kohno, M. *et al.* Intracellular role for sphingosine kinase 1 in intestinal adenoma cell proliferation. *Mol Cell Biol* 26, 7211-23 (2006).
191. Dayon, A. *et al.* Sphingosine kinase-1 is central to androgen-regulated prostate cancer growth and survival. *PLoS One* 4, e8048 (2009).
192. Sukocheva, O., Wang, L., Verrier, E., Vadas, M.A. & Xia, P. Restoring endocrine response in breast cancer cells by inhibition of the sphingosine kinase-1 signaling pathway. *Endocrinology* 150, 4484-92 (2009).
193. Catalano, R.D. *et al.* Hypoxia and prostaglandin E receptor 4 signalling pathways synergise to promote endometrial adenocarcinoma cell proliferation and tumour growth. *PLoS One* 6, e19209 (2011).
194. Benito, J. *et al.* Pronounced hypoxia in models of murine and human leukemia: high efficacy of hypoxia-activated prodrug PR-104. *PLoS One* 6, e23108 (2011).
195. Doherty, G.A. *et al.* Proneoplastic effects of PGE2 mediated by EP4 receptor in colorectal cancer. *BMC Cancer* 9, 207 (2009).
196. Oshima, H. *et al.* Activation of epidermal growth factor receptor signaling by the prostaglandin E(2) receptor EP4 pathway during gastric tumorigenesis. *Cancer Sci* 102, 713-9 (2011).
197. Pozzi, A. *et al.* Colon carcinoma cell growth is associated with prostaglandin E2/EP4 receptor-evoked ERK activation. *J Biol Chem* 279, 29797-804 (2004).
198. Murn, J., Alibert, O., Wu, N., Tendil, S. & Gidrol, X. Prostaglandin E2 regulates B cell proliferation through a candidate tumor suppressor, Ptger4. *J Exp Med* 205, 3091-103 (2008).
199. Naderi, S., Wang, J.Y., Chen, T.T., Gutzkow, K.B. & Blomhoff, H.K. cAMP-mediated inhibition of DNA replication and S phase progression: involvement of Rb, p21Cip1, and PCNA. *Mol Biol Cell* 16, 1527-42 (2005).

200. Bidwell, P., Joh, K., Leaver, H.A. & Rizzo, M.T. Prostaglandin E2 activates cAMP response element-binding protein in glioma cells via a signaling pathway involving PKA-dependent inhibition of ERK. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 91, 18-29 (2010).
201. Malissein, E. *et al.* PGE(2) receptor subtype functionality on immature forms of human leukemic blasts. *Leuk Res* 30, 1309-13 (2006).
202. Okamura, H. *et al.* Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378, 88-91 (1995).
203. Born, T.L., Thomassen, E., Bird, T.A. & Sims, J.E. Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling. *J Biol Chem* 273, 29445-50 (1998).
204. Olee, T., Hashimoto, S., Quach, J. & Lotz, M. IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses. *J Immunol* 162, 1096-100 (1999).
205. Quigley, D.A. *et al.* Network analysis of skin tumor progression identifies a rewired genetic architecture affecting inflammation and tumor susceptibility. *Genome Biol* 12, R5 (2011).
206. Tomura, M. *et al.* A critical role for IL-18 in the proliferation and activation of NK1.1+ CD3- cells. *J Immunol* 160, 4738-46 (1998).
207. Salcedo, R. *et al.* MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *J Exp Med* 207, 1625-36 (2010).
208. Kojima, H. *et al.* Interleukin-18 activates the IRAK-TRAF6 pathway in mouse EL-4 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 244, 183-6 (1998).
209. Kalina, U. *et al.* IL-18 activates STAT3 in the natural killer cell line 92, augments cytotoxic activity, and mediates IFN-gamma production by the stress kinase p38 and by the extracellular regulated kinases p44erk-1 and p42erk-21. *J Immunol* 165, 1307-13 (2000).
210. Chandrasekar, B. *et al.* Activation of intrinsic and extrinsic proapoptotic signaling pathways in interleukin-18-mediated human cardiac endothelial cell death. *J Biol Chem* 279, 20221-33 (2004).
211. Tsutsui, H. *et al.* IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J Immunol* 157, 3967-73 (1996).
212. Pchejetski, D. *et al.* Chemosensitizing effects of sphingosine kinase-1 inhibition in prostate cancer cell and animal models. *Mol Cancer Ther* 7, 1836-45 (2008).
213. Paugh, S.W. *et al.* A selective sphingosine kinase 1 inhibitor integrates multiple molecular therapeutic targets in human leukemia. *Blood* 112, 1382-91 (2008).
214. Akao, Y. *et al.* High expression of sphingosine kinase 1 and S1P receptors in chemotherapy-resistant prostate cancer PC3 cells and their camptothecin-induced up-regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 1284-90 (2006).
215. Gude, D.R. *et al.* Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal. *FASEB J* 22, 2629-38 (2008).

216. George, R.J., Sturmoski, M.A., Anant, S. & Houchen, C.W. EP4 mediates PGE2 dependent cell survival through the PI3 kinase/AKT pathway. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 83, 112-20 (2007).
217. Babaev, V.R. *et al.* Macrophage EP4 deficiency increases apoptosis and suppresses early atherosclerosis. *Cell Metab* 8, 492-501 (2008).
218. Lapidot, T. Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions. *Ann N Y Acad Sci* 938, 83-95 (2001).
219. Balkwill, F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 4, 540-50 (2004).
220. Bradstock, K.F. *et al.* Effects of the chemokine stromal cell-derived factor-1 on the migration and localization of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells within bone marrow stromal layers. *Leukemia* 14, 882-8 (2000).
221. Juarez, J. *et al.* CXCR4 antagonists mobilize childhood acute lymphoblastic leukemia cells into the peripheral blood and inhibit engraftment. *Leukemia* 21, 1249-57 (2007).
222. Yanai, N., Matsui, N., Furusawa, T., Okubo, T. & Obinata, M. Sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid trigger invasion of primitive hematopoietic cells into stromal cell layers. *Blood* 96, 139-44 (2000).
223. Seitz, G., Boehmler, A.M., Kanz, L. & Mohle, R. The role of sphingosine 1-phosphate receptors in the trafficking of hematopoietic progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci* 1044, 84-9 (2005).
224. Juarez, J.G. *et al.* Sphingosine-1-phosphate facilitates trafficking of hematopoietic stem cells and their mobilization by CXCR4 antagonists in mice. *Blood* (2011).
225. Amin, M.A. *et al.* Interleukin-18 induces angiogenic factors in rheumatoid arthritis synovial tissue fibroblasts via distinct signaling pathways. *Arthritis Rheum* 56, 1787-97 (2007).
226. Zou, W. *et al.* Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 7, 1339-46 (2001).
227. Gao, H., Priebe, W., Glod, J. & Banerjee, D. Activation of signal transducers and activators of transcription 3 and focal adhesion kinase by stromal cell-derived factor 1 is required for migration of human mesenchymal stem cells in response to tumor cell-conditioned medium. *Stem Cells* 27, 857-65 (2009).
228. Ahr, B., Denizot, M., Robert-Hebmann, V., Brelot, A. & Biard-Piechaczyk, M. Identification of the cytoplasmic domains of CXCR4 involved in Jak2 and STAT3 phosphorylation. *J Biol Chem* 280, 6692-700 (2005).
229. Katoh, H. *et al.* COX-2 and prostaglandin EP3/EP4 signaling regulate the tumor stromal proangiogenic microenvironment via CXCL12-CXCR4 chemokine systems. *Am J Pathol* 176, 1469-83 (2010).
230. Kabashima, K. *et al.* Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nat Med* 9, 744-9 (2003).

231. Zhao, B. *et al.* Epstein-Barr virus exploits intrinsic B-lymphocyte transcription programs to achieve immortal cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 14902-7 (2011).

